

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**TESIS DOCTORAL**

**Aplicación de nuevas estrategias en el diagnóstico y profilaxis de la brucelosis  
producida por *Brucella melitensis* en rumiantes domésticos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

**Marta Pérez Sancho**

Directores

Julio Álvarez  
Joaquín Goyache  
Lucas Domínguez

**Madrid, 2014**

TESIS DOCTORAL

# **Aplicación de nuevas estrategias en el diagnóstico y profilaxis de la brucelosis producida por *Brucella melitensis* en rumiantes domésticos**



Marta Pérez Sancho

Departamento de Sanidad Animal  
**Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense Madrid**

Servicio de Zoonosis Emergentes, de Baja Prevalencia y Agresivos Biológicos  
**Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense Madrid**

Madrid, 2014



**CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Sanidad Animal**

**CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)**

**Servicio de Zoonosis Emergentes, de Baja Prevalencia y Agresivos Biológicos**



## **TESIS DOCTORAL**

***APLICACIÓN DE NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL DIAGNÓSTICO  
Y PROFILAXIS DE LA BRUCELOSIS PRODUCIDA  
POR *Brucella melitensis* EN RUMIANTES DOMÉSTICOS***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Marta Pérez Sancho**

**Bajo la dirección de los doctores:**

**Julio Álvarez, Joaquín Goyache y Lucas Domínguez**

**Madrid, 2014**







UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

D. Lucas Domínguez Rodríguez, Director de Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) y Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, D. Joaquín Goyache Goñi, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria y D. Julio Álvarez Sánchez Investigador Doctor del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET),

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral que lleva por título **“Aplicación de nuevas estrategias en el diagnóstico y profilaxis de la brucelosis producida por *Brucella melitensis* en rumiantes domésticos”** ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria Dña. Marta Pérez Sancho en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense bajo nuestra dirección y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense.

Fdo. Lucas Domínguez

Fdo. Joaquín Goyache

Fdo. Julio Álvarez



*El presente trabajo ha sido realizado gracias a:*



Comunidad de Madrid,  
IV Plan Regional de Investigación Científica  
e Innovación Tecnológica y Fondo Social Europeo  
**Contrato de Personal de Apoyo a la Investigación**

*En el marco del proyecto:*



Ministerio de Ciencia e Innovación,  
Plan Nacional de I+D+i  
**“Aplicación de nuevos métodos para el diagnóstico y control  
de la brucelosis ovina, caprina y bovina por *Brucella melitensis* y *B. abortus*”  
(AGL2009-12674)**

*Y con la colaboración de:*



Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente  
**Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria**



‘Cuánto más grande es el caos, más próxima está la solución’  
Mao-Tse-Tung (1893-1976)

‘Una experiencia nunca es un fracaso, pues siempre viene a demostrar algo’  
Thomas A. Edison (1847-1931)

‘Con el conocimiento, se acrecientan las dudas’  
Johann Wolfgang Von Goethe (1749-1832)





A mis padres



## AGRADECIMIENTOS

Dice la canción *Just Breathe* (Pearl Jam) que es afortunado aquel que puede contar con las dos manos a sus seres queridos, estos agradecimientos han hecho que me de cuenta de que soy tremendamente afortunada. Por ello, sólo puedo decir ¡MUCHAS GRACIAS!:

A Lucas Domínguez, por dejarme crecer sabiendo que siempre puedo contar con su red de seguridad, por su entusiasmo contagioso y su puerta siempre abierta, por su fe en nosotros que hace que nos creamos capaces de poder con todo, por su sabiduría que nos guía siempre hacia delante.

A Joaquín Goyache, por su dedicación plena a mi (y todos los que nos hemos cruzado alguna vez en su camino), por no conocer el NO en su vocabulario cuando se trata de ayudar a los demás, por sus charlas siempre cargadas de ánimos y energía, por su buen hacer que ha quedado reflejado en esta tesis.

A Julio Álvarez por su paciencia, por su brillantez con la que ha logrado iluminarme en mis momentos de mayor oscuridad, por obligarme a disfrutar de cada paso de esta tesis (hasta los más difíciles) y enseñarme lo maravillosa que puede ser esta profesión, por sus consejos de hermano mayor cargados de sabiduría siempre con humor, por hacerme sentir que esté donde esté siempre está a mi lado.

A VISAVET como centro de investigación pero, sobre todo, como entidad humana: sólo aquél que ha salido a las tantas, cansado y preguntándose ¿para qué? y sólo con cruzar la puerta el día siguiente ha encontrado la respuesta sabe lo que este Centro es, que está impregnado de nosotros, de todos los que han pasado por aquí y los que pasarán, construido a base de ganas, ilusión y esfuerzo. Nombrar a todos los que han puesto su granito de arena para que esta tesis saliera adelante y yo no desfalleciera en el intento ocuparía otra tesis, por eso sólo puedo decir que me siento muy afortunada de formar parte de esta familia.

Al grupo NED (Julio, Nerea, Irene, Teresa, Sergio) por hacerme entender lo que significa pertenecer a un grupo, por permitirme aprender a su lado, por hacer de las jornadas laborales más largas, las más divertidas, por ayudarme a mantener la cordura todo este tiempo, por su amistad. A Nerea, por su paciencia infinita y su ilusión en todo lo que hace, por recordarme de vez en cuando '*que la vida es un carnaval*', a Irene por las infinitas horas de laboratorio que hemos compartido, por ser una de las personas más eficaces que conozco, por no fallarme jamás, a Teresa por ser un ejemplo de compromiso con lo que hace, por sus consejos de hermana pequeña tantas veces convertida en hermana mayor, a Sergio por su ayuda y apoyo siempre que se le requiere, por el toque de calidad que le ha dado a esta tesis.

A D. Fernando Crespo León, por sus escritos sobre brucelosis ovina y caprina que han sido una referencia para mí, aunque no haya tenido la suerte de conocerle me gustaría agradecerle el valioso legado que nos ha dejado.

A todos los profesionales que han permitido que este trabajo pudiera realizarse: a todos los compañeros del Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe, a Félix Goyache y su equipo del Área de Genética y Reproducción Animal (SERIDA) (por su magnífico estudio de paternidad), a todos los profesionales del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente así como de la Comunidad de Madrid (por su apoyo y ayuda inestimables), a Antonio Rodríguez Bertos (por ayudarnos con la maravillosa Anatomía Patológica), a Mercedes Domínguez y su equipo del Instituto de Salud Carlos III (por su interés y su ayuda infinitos), a todo el personal de la biblioteca (por su ayuda incansable en conseguir cientos de artículos, libros, etc.) y secretaría (por su paciencia y apoyo en todo el papeleo de tantos años) de la Facultad de Veterinaria de la UCM, a Emilio Legaz (por su buena disposición siempre), a Alberto Díez-Guerrier (por ser una fuente de soluciones, nunca podré estar suficientemente agradecida), a todos los investigadores de otros laboratorios que he tenido la oportunidad de conocer (Central Veterinary Institute, Instituto Superiore di Sanità, SVA National Veterinary Institute) y a tantos que me dejaré en el tintero y pido que me disculpen.

A mis amigas (Elsa, Ruth, Ana, Cita, Curry y Raquel), por su cuarto de siglo de amistad, por conocernos tan bien que ya no nos podamos separar pase lo que pase, por mis 'sobrinos' que me hacen olvidarme de todo, porque nos seguimos riendo de las mismas historias aunque las recordemos por centésima vez.

A Carmen, Teresa e Irene, por nuestras escapadas que tantas veces han sido una tabla de salvación para mí, por las risas, los secretos y los consejos, porque una persona con pocos amigos como yo, sabe la suerte que tiene de haberos encontrado.

A mis padres, por ser un ejemplo de amor incondicional (como canta Serrat *'perdiendo la vida, mimando su infancia, velando su sueño, llorando su llanto con tanta abundancia'*), por enseñarme a vivir de acuerdo a lo que tengo, con lo que pienso y sobre todo, con lo que siento. A mamá Sancho por enseñarme a dar todo en cada cosa que hago (su 'aquí y ahora'), por aportar un toque artístico a todo lo que pasa por sus manos –incluida esta tesis-. A papá Pérez por transmitirme la importancia de ser honrado y consecuente con todo lo que se hace en la vida, por enseñarme que se puede avanzar a mejor siempre que uno lo desea lo suficiente. A mi hermano Álvaro por ponerme el listón tan alto que siempre haya sido un motivo para levantarme e intentarlo una vez más, por sus consejos escasos en palabras pero abundantes de sentido común, por cuidarme aunque nos separen miles de kilómetros, por traer a Vanessa y su luz a nuestra familia.

A mi familia (familia Pérez, familia Sancho y mi nueva familia Muñoz -en especial a Caty por ser un ejemplo de fortaleza y valor-). Querría hacer una mención especial a mis abuelos Bernardo- Boni y Martín-Goya porque realmente creo que sus nietos somos el fruto de todo su sacrificio, esfuerzo y lucha por darnos una vida que ellos no pudieron tener. Y a mi tía Bruni y mi tío Jose (allá donde estés, finalmente gané esta batalla a los 'bichitos') por ser unos segundos padres cuyo amor y apoyo jamás podré agradecer.



A Antonio, por esto que tenemos, que pasó de repente, sin itinerario, que se ha convertido en una pequeña familia que sólo nosotros sabemos lo grande que es. Gracias por elegirme en este viaje, por acompañarme siempre incluso en mis noches de insomnio que a veces han sido de los dos, por conocerme tan bien, por suplir mis carencias y transmitirme su tranquilidad, por hacerme reír, por nuestro hogar.

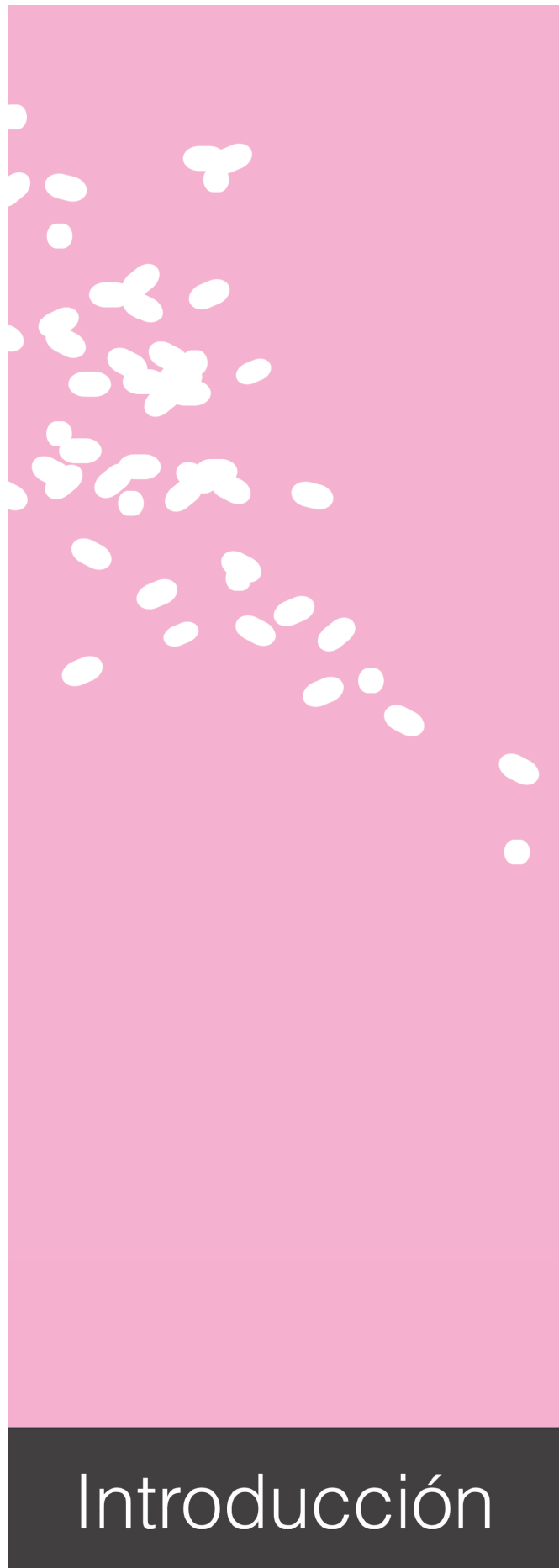
Y por último, pero no por ello menos importante, a todos los animales, que de un modo u otro han formado parte de esta tesis, en especial a las ovejas de los experimentos que con tanta paciencia ha aguantado siempre que esta doctoranda aprendiera lecciones que ellas tan bien conocen.



# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| I. PERSPECTIVA HISTÓRICA Y ENCUADRE TAXONÓMICO .....   | 3  |
| II. EL AGENTE ETIOLÓGICO: <i>Brucella melitensis</i> .....   | 8  |
| II. A. Características generales .....   | 8  |
| II. B. Características estructurales .....   | 10 |
| II. C. Características genéticas .....   | 13 |
| III. BRUCELOSIS OVINA Y CAPRINA (BOC).....   | 14 |
| III. A. Patogenia, sintomatología, vías de transmisión y rango de hospedadores de <i>B. melitensis</i> ..... | 14 |
| III. B. Distribución geográfica.....   | 27 |
| Situación de España .....  | 30 |
| III. C. Repercusiones sanitarias y económicas de la BOC .....  | 31 |
| III. D. <i>Brucella melitensis</i> como potencial arma biológica .....                                       | 36 |
| IV. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE BOC: MÁS DE 100 AÑOS DE LUCHA CONTRA UNA ZOONOSIS DIFÍCIL DE ERRADICAR .....   | 37 |
| IV. I. Medidas higiénico-sanitarias y de manejo .....  | 40 |
| IV. II. Diagnóstico y sacrificio de animales reactivos .....   | 41 |
| IV. II. A. Diagnóstico indirecto de la brucelosis ovina y caprina .....                                      | 41 |
| Técnicas diagnósticas basadas en la respuesta inmune serológica frente a <i>B. melitensis</i> .....          | 44 |
| A. Test del Rosa de Bengala (RB) .....   | 44 |
| B. Técnica de Fijación del Complemento (FC) .....  | 47 |
| C. Seroaglutinación lenta en tubo (SAT).....   | 49 |
| D. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....  | 49 |
| E. Ensayo de Fluorescencia Polarizada (FPA).....   | 56 |
| F. Test del anillo en leche (MRT, Milk Ring Test).....   | 57 |
| G. Otras técnicas serológicas para el diagnóstico de BOC .....   | 60 |
| Técnicas diagnósticas basadas en la respuesta inmune celular frente a <i>B. melitensis</i> .....             | 60 |
| A. Prueba cutánea de la brucelina .....  | 60 |
| B. Detección de Interferón gamma.....  | 61 |
| IV. II. B. Diagnóstico directo de la brucelosis ovina y caprina .....  | 63 |
| A. Bacteriología .....   | 63 |
| B. Detección molecular .....   | 65 |
| IV. III. Vacunación frente a <i>Brucella melitensis</i> en pequeños rumiantes .....                          | 68 |
| IV. III. A. <i>Brucella melitensis</i> Rev. 1 .....  | 69 |
| Historia de la Rev. 1 .....  | 69 |
| Características y limitaciones de Rev. 1.....  | 72 |
| 1. Virulencia residual en los pequeños rumiantes.....  | 72 |
| 2. Potencial zoonótico y resistencia a la estreptomina.....  | 75 |
| 3. Inestabilidad de la cepa vacunal Rev.1 .....  | 75 |
| 4. Interferencia diagnóstica con pruebas serológicas rutinarias (RB, FC, ELISA).....                         | 76 |
| Aplicaciones de Rev. 1 .....   | 85 |

|   |            |
|---|------------|
| IV.III. B. Otras vacunas frente a <i>B. melitensis</i> .....  | 88         |
| IV.IV. Otros aspectos a considerar en los programas de erradicación y control de BOC .....  | 92         |
| V. PROGRAMAS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE BOC.....  | 95         |
| Programa de control y erradicación de BOC en Europa y en España.....  | 101        |
| <b>OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS .....</b>   | <b>113</b> |
| <b>CAPÍTULO 1: DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>B. melitensis</i> Y OTRAS ESPECIES ZONÓTICAS DE <i>Brucella</i>.....</b> | <b>119</b> |
| RESUMEN .....   | 121        |
| ESTUDIO 1 .....   | 125        |
| ESTUDIO 2.....  | 131        |
| ESTUDIO 3.....  | 138        |
| <b>CAPÍTULO 2: ERRADICACIÓN Y CONTROL DE <i>B. melitensis</i> .....</b>   | <b>143</b> |
| RESUMEN .....   | 145        |
| ESTUDIO 1 .....   | 150        |
| ESTUDIO 2.....  | 167        |
| ESTUDIO 3.....  | 173        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>179</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>205</b> |
| CONCLUSIONES .....  | 207        |
| CONCLUSIONS .....   | 208        |
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>210</b> |
| RESUMEN .....   | 211        |
| SUMMARY.....  | 215        |
| <b>REFERENCIAS.....</b>   | <b>219</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>271</b> |
| ANEXO I- LISTA DE ABREVIATURAS .....  | 273        |
| ANEXO II- LISTA DE FIGURAS .....  | 275        |
| ANEXO III- LISTA DE TABLAS .....  | 277        |







## I. PERSPECTIVA HISTÓRICA Y ENCUADRE TAXONÓMICO

Si bien hasta mediados del S.XIX la brucelosis no había sido caracterizada de manera pormenorizada como enfermedad ni su agente causal identificado, esta patología ya había sido referida como una enfermedad debilitante desde la antigüedad, cuya existencia había dejado huella en la historia mucho tiempo antes de su primera descripción. La referencia histórica más antigua que se conoce hasta la fecha ha sido descrita por D'Anastasio *et al.* (D'Anastasio *et al.*, 2011), quienes diagnosticaron brucelosis vertebral en un ancestro del ser humano (*Australopithecus africanus*) perteneciente al Plioceno (hace 2,3-2,5 millones de años).

Diversos estudios paleontológicos han revelado la existencia de lesiones óseas compatibles con brucelosis en individuos que vivieron en diferentes épocas de la historia como la Edad de Bronce (Ortner y Frohlich., 2007; Rashidi *et al.*, 2001) y la Edad del Cobre (Etxeberria, 1994). Se ha especulado que la brucelosis podría haber sido la responsable de la 'Quinta Plaga de Egipto' afectando al ganado equino, camélidos y rumiantes hacia el año 1600 a.C. (Pappas *et al.*, 2006a). El examen de huesos pélvicos de individuos del Antiguo Egipto reveló la existencia de lesiones típicas de esta patología (como sacroilitis en restos humanos que datan del 750 a.C.) (Pappas y Papadimitriou, 2007). Kousoulis *et al.* (Kousoulis *et al.*, 2012) han sugerido recientemente la posibilidad de que la plaga de Tebas (430-420 a.C.) descrita por Sófocles en su obra *Edipo rey* hubiera tenido lugar en realidad y fuera debida a *Brucella abortus*. La posible importancia de la enfermedad en la antigüedad queda de manifiesto por el análisis de restos arqueológicos encontrados en la población de Herculano, en la Antigua Roma (79 a.C.), que sugieren que un alto porcentaje (15-20%) de la población padeciera esta enfermedad al encontrarse lesiones óseas compatibles con brucelosis, así como bacterias que podrían pertenecer al género *Brucella* (Capasso, 1999; Capasso, 2002).

Aunque diferentes autores a lo largo de la historia describieron la existencia de una enfermedad febril crónica reincidente en la zona Mediterránea, la brucelosis no despertó especial interés hasta el S. XIX, cuando esta patología afectó de manera

masiva a soldados británicos destinados en la isla de Malta (convertida en una base militar inglesa) (Crespo, 1994). Este hecho podría estar posiblemente asociado con el consumo de leche cruda de cabra que tradicionalmente se daba a los enfermos por su supuesto efecto curativo (práctica que sigue existiendo a día de hoy en algunas partes del mundo) (Memish y Balkhy, 2004). En 1863 el doctor Jeffrey Allen Marston, médico cirujano destinado en la isla, realizó la primera descripción detallada de la brucelosis a partir de su propia sintomatología, diferenciándola de las fiebres tifoideas y denominándola 'Fiebre gástrica remitente mediterránea' (Marston, 1863). Sir David Bruce (médico inglés cuyo apellido más tarde daría nombre a este género bacteriano) fue enviado a Malta en 1884 con el fin de estudiar la preocupante enfermedad que afectaba cada vez a más militares ingleses residentes en la isla. En 1887 Sir Bruce aisló el agente causal de la brucelosis a partir del bazo de cuatro soldados enfermos, denominándolo *Micrococcus melitensis* (de Melita  $\approx$  miel, típico producto de Malta) (Bruce, 1887). Este aislamiento fue confirmado por un colaborador de Sir Bruce, el Dr. Methew Louis Hughes, quien publicó en 1897 un manuscrito describiendo pormenorizadamente los hallazgos clínicos y patológicos de esta enfermedad a la que asignaría el nombre de 'Fiebre ondulante', en referencia a uno de los síntomas típicos de la patología (Vassallo, 1992). En 1897, Sir Almoth E. Wright y Sir David Semple desarrollaron la primera prueba de seroaglutinación lenta o en tubo utilizando bacterias muertas como antígeno para el diagnóstico de la enfermedad (Wright y Semple, 1897).

Casi de manera simultánea en Dinamarca el Dr. L. F. Benhard Bang describió por primera vez el aislamiento de otro miembro del género *Brucella*, *B. abortus* (en un principio denominado *Bacillus abortus*), a partir de muestras de fetos y anejos fetales de ganado bovino (Bang, 1906).

En 1904 se formó la 'Comisión de la Fiebre Mediterránea', encabezada por el propio Sir Bruce, para abordar el problema de la brucelosis en la isla de Malta (Vassallo, 1992). El uso de la cabra como modelo animal para el estudio de esta patología fue prácticamente fortuito. Sorprendentemente, y a pesar de que aparentemente las cabras no enfermaban de brucelosis, el doctor maltés Thermistocles Zammit detectó aglutininas y bacterias en sangre y leche de algunos animales estudiados (Zammit, 1905). A partir de ese momento, el consumo de leche

de cabra se prohibió entre las tropas inglesas de Malta solventando en la práctica este importante problema de salud pública en los militares británicos (Nicoletti, 2002)

En 1914, al otro lado del océano Atlántico, se identificó la última de las especies zoonóticas más extendidas de este género bacteriano: *B. suis* (originalmente conocida como *American melitensis*) (Traum, 1914). La relación entre *B. melitensis* y *B. abortus* fue determinada por Dra. Alice Catherine Evans algunos años más tarde (Evans, 1918). En 1920, el Dr. Karl Friederich Meyer y el Dr. Eduard B. Shaw propusieron la formación de un nuevo género bacteriano, el género *Brucella*, y renombraron la bacteria denominada *M. melitensis* como *Brucella melitensis* atendiendo a criterios como su susceptibilidad a diferentes colorantes y su capacidad de aglutinación, estableciendo que los patógenos causantes de la brucelosis humana y caprina eran indistinguibles (Meyer y Shawn, 1920). El género estaba formado en aquel momento por *B. melitensis* y *B. abortus*, hasta que el Dr. I. Forest Huddleson propuso la incorporación de *B. suis* en este nuevo género bacteriano (Huddleson, 1931). Poco tiempo después, el género adoptó dos nuevos miembros: *B. ovis* (Buddle, 1956) (agente no zoonótico responsable de la Epididimitis Contagiosa del carnero) y *B. neotomae* (Stoenner y Lackmann, 1957) (aislada en roedores y que no se ha vinculado con enfermedad en humanos hasta la fecha). Diez años más tarde se incluyó *B. canis* (Carmichael y Bruner, 1968), que naturalmente se asocia a perros pero que, ocasionalmente, puede causar enfermedad en el hombre.

Actualmente, el género *Brucella* se incluye dentro de la clase *Proteobacteria* subdivisión alfa-2 atendiendo a su secuencia de ADN ribosómico y la composición del lípido A del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa (Moreno *et al.*, 1990). Considerando la secuencia del ADNr 16S, el género *Brucella* se clasifica dentro del orden *Rhizobiales* englobado en la familia *Brucellaceae* (Yanagi y Yamasato, 1993), junto a otro conjunto de familias muy heterogéneas. La familia *Brucellaceae* está compuesta por los géneros *Brucella*, *Mycoplana* y *Ochrobactrum* (Bergey y Holt, 1994). *Ochrobactrum intermedium* es una especie muy relacionada filogenéticamente con el género *Brucella* (Moreno *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 1998) lo que la convierte en la responsable de una gran parte de los

resultados falsos positivos en las técnicas moleculares basadas en la detección de ácidos nucleicos (Romero *et al.*, 1995).

La taxonomía tradicional del género *Brucella* (un género dividido en especies, algunas de las cuales presentan diferentes biovariedades o biovares) basada en características fenotípicas (susceptibilidad a fagos, seroaglutinación, crecimiento en presencia de varios colorantes, etc.) (Alton *et al.*, 1988) y la preferencia de hospedador (del cual se ha aislado primariamente y en el que produce una enfermedad seria) (Ficht, 2010) se vio cuestionada en los años 80 atendiendo a criterios moleculares. Verger *et al.* (Verger *et al.*, 1985) determinaron la existencia de un alto grado de homología (superior al 90%) entre diferentes especies de este género mediante ensayos de hibridación ADN-ADN (un hecho observado por Hoyer *et al.* veinte años antes) (Hoyer y McCullough, 1968). Por ello, en 1988 el Subcomité de Taxonomía de *Brucella* estableció que este género bacteriano estaba formado únicamente por una especie (*B. melitensis*) que se dividía en diferentes biovares; de este modo, *B. abortus*, *B. canis* y el resto de especies descritas hasta la fecha pasaban a ser biovares de *B. melitensis* (Corbel, 1988). A pesar de esta modificación, y fuera del contexto taxonómico, se recomendó el mantenimiento de la clasificación tradicional con el fin de evitar confusiones. Esta nueva nomenclatura no tuvo una buena acogida entre la comunidad científica (Gargani y Lopez-Merino, 2006) ya que este cambio, entre otras cosas, suponía un cierto riesgo en términos de bioseguridad para los investigadores poco familiarizados con el género *Brucella* que desconocían, por ejemplo, las diferencias de patogenicidad de los diferentes miembros (Ficht, 2010).

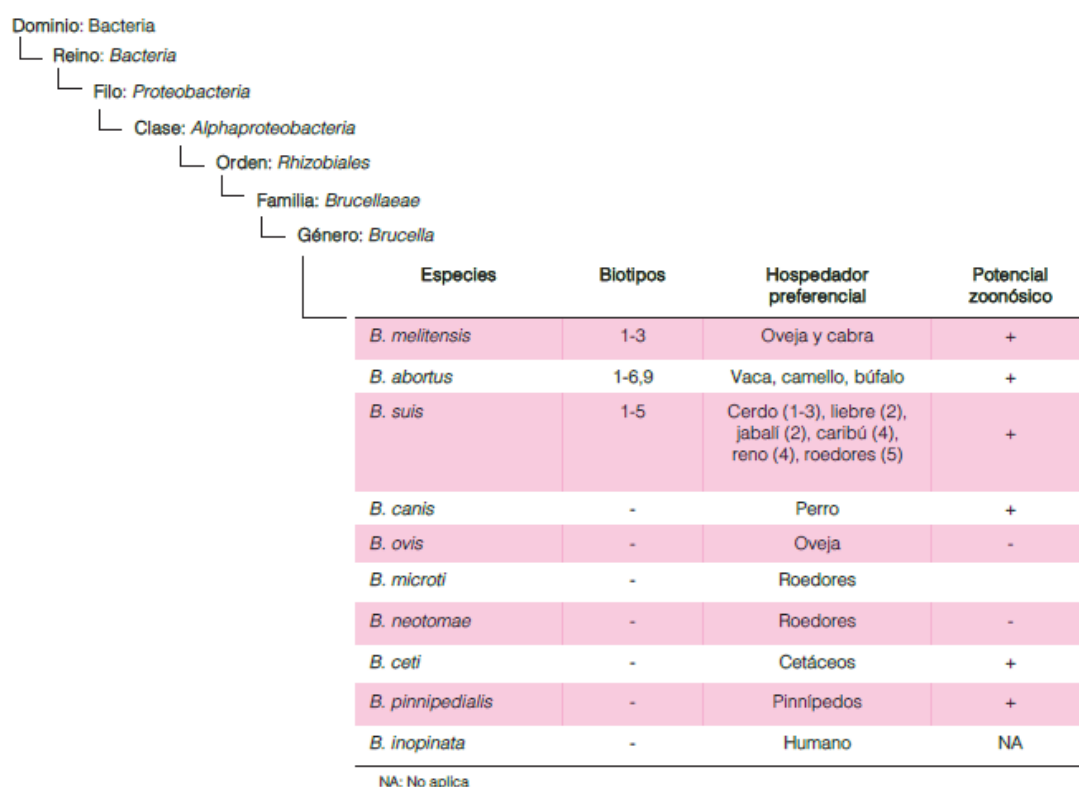
La reconsideración como criterio de clasificación de ciertas propiedades biológicas [como la preferencia de hospedador (en el que el grado de adaptación es mayor que en cualquier otra especie susceptible de infección)] abrió el debate en torno a la validez del criterio de hibridación ADN-ADN para definir el concepto de especie bacteriana. En 2003, el Subcomité de Taxonomía de *Brucella* acordó unánimemente retomar la 'taxonomía clásica' de este género (dividido en diferentes especies y biovares, en algunos casos) (Osterman y Moriyon, 2006).



En los años 90 este género bacteriano volvería a sorprender a la comunidad científica al descubrir su adaptación a un nuevo medio, el ecosistema marino: a partir de 1994, momento en el que se describió por primera vez el aislamiento de *Brucella* en animales acuáticos (Ewalt *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1994), este patógeno se ha aislado en multitud de especies marinas diferentes (Foster *et al.*, 2002). La primera propuesta de clasificación de estos nuevos miembros del género *Brucella* fue realizada por Jahans *et al.*, quienes propusieron aunar todos los aislados en una misma especie: *B. maris* (Jahans *et al.*, 1997). Atendiendo a diferentes propiedades como la secuencia del locus *omp2*, la preferencia de hospedador y las diferencias en el metabolismo de la L- arabinosa, D-galactosa y D-xilosa, se propuso su división en dos nuevas entidades: *B. ceti* y *B. pinnipedialis* (Cloeckaert *et al.*, 2001b; Cloeckaert *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2007), nomenclatura actualmente aceptada aunque no exenta de debate (Groussaud *et al.*, 2007).

En los últimos diez años se han descrito otras dos especies bacterianas: *B. microti* [aislada primariamente en un topillo (*Microtus arvalis*) (Hubalek *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008b) y más tarde en zorros (*Vulpes vulpes*) (Scholz *et al.*, 2009) e incluso en el suelo (Scholz *et al.*, 2008a)] y *B. inopinata* (únicamente aislada en una persona) (De *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2010). Éstas podrían no ser las últimas especies incorporadas, ya que este género podría verse ampliado hasta abarcar un total de 14 miembros si se confirmaran como nuevas especies algunos aislamientos recientes: la cepa BO2 (aislado de un paciente con neumonía crónica obstructiva) (Tiller *et al.*, 2010b), los cultivos obtenidos de muestras de primates (Schlabritz-Loutsevitch *et al.*, 2009) y los aislamientos de roedores autóctonos (*Rattus assimilis*, *Melomys cervinipes* y *Melomys lutillus*) en Australia (Tiller *et al.*, 2010a) y de ranas (*Pyxicephalus adspersus*) en Tanzania (Eisenberg *et al.*, 2012).

La taxonomía de *Brucella* actualmente aceptada por el Subcomité de Taxonomía de *Brucella* se encuentra disponible en <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm> (Figura 1). Los resultados de estudios recientes han sugerido la posible unión de los géneros *Ochrobactrum* y *Brucella* basándose en la secuencia de la región ITS1 (Lebuhn *et al.*, 2006) aunque a efectos prácticos esta clasificación podría resultar conflictiva.



**Figura I.** Encuadre taxonómico y principales características de las especies del género *Brucella* (Godfroid *et al.*, 2011; OIE, 2009a).

## II. EL AGENTE ETIOLÓGICO: *Brucella melitensis*

### II. A. Características generales

Tradicionalmente el género *Brucella* ha incluido bacterias patógenas que no se multiplican en el medio ambiente sino que se transmiten de hospedador a hospedador, en los que se sitúa intracelularmente excepto en la fase previa a su diseminación (Moreno *et al.*, 2002). Se trata de cocobacilos Gram negativos de vida intracelular facultativa (Alton *et al.*, 1988), lo que explica la respuesta inmune (RI) del hospedador tras la infección, la resistencia de estas bacterias a ciertos antibióticos y algunas características típicas de la enfermedad que provoca (Nicoletti, 2010). Son microorganismos no fermentativos e inmóviles (aunque poseen genes para sintetizar flagelos) (Fretin *et al.*, 2005) que carecen de los factores de virulencia clásicos (Gorvel y Moreno, 2002). Pueden producir ureasa además de reducir los nitratos en

nitritos. Los miembros de esta especie bacteriana son también positivos a la prueba de catalasa y, frecuentemente, también a la de la oxidasa (Alton *et al.*, 1988).

Diferentes propiedades físico-químicas permiten la clasificación de *Brucella* en especies y biovars (Alton *et al.*, 1988; Anon, 2000): (i) requerimientos de CO<sub>2</sub>, (ii) habilidad para usar el ácido glutámico, ornitina, lisina y ribosa, (iii) producción de H<sub>2</sub>S, (iv) crecimiento en presencia de colorantes como tionina y fucsina básica en concentraciones de 1:25000, 1:50000 y 1:100000, (v) aglutinación por antisueros contra los epítomos A y M del LPS presente en las cepas lisas, (vi) actividad de la ureasa y (vii) susceptibilidad a la lisis por bacteriófagos como Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar<sub>1</sub> (Iz<sub>1</sub>) (usados para la diferenciación de las especies lisas de *Brucella*) y R/C (para *B. ovis* y *B. canis*). Las principales propiedades bioquímicas de *B. melitensis* y las características diferenciales que presenta con las otras especies/biovars del género *Brucella* se resumen en la Tabla I. De manera general, se considera que la susceptibilidad a la lisis por fagos es especialmente útil para la identificación a nivel de especie, mientras que la seroaglutinación, susceptibilidad a colorantes y la producción de H<sub>2</sub>S lo son a nivel de biovar (Whatmore, 2009).

La mayoría de las cepas de *B. melitensis* son susceptibles *in vitro* a un gran número de antibióticos como la gentamicina, doxiciclina y rifampicina (Maves *et al.*, 2011). La sensibilidad a ciertos antibióticos puede constituir una herramienta para identificar ciertas cepas de *Brucella*; por ejemplo la resistencia a la estreptomicina permite diferenciar la cepa vacunal Rev. 1 de *B. melitensis* de otras cepas de biovar 1 de campo susceptibles a este antimicrobiano (Alton *et al.*, 1988).

**Tabla I.** Características diferenciales de las especies del género *Brucella* (Alton *et al.* 1988; OIE 2009a)

| Especie                 | Bloques | Morfología <sup>a</sup> | Oxidasa        | Ureasa         | CO <sub>2</sub> <sup>b</sup> | H <sub>2</sub> S <sup>c</sup> | Crecimiento en presencia de colorantes (20 µg/ml) |                | Aglutinación con sueros monoclonal |                |   | Lisis mediante fagos <sup>d</sup> |                |                 |     |
|-------------------------|---------|-------------------------|----------------|----------------|------------------------------|-------------------------------|---|----------------|------------------------------------|----------------|---|-----------------------------------|----------------|-----------------|-----|
|                         |         |                         |                |                |                              |                               | Tionina   | Fucsina        | A                                  | M              | R | Tb                                | Wb             | Iz <sub>1</sub> | R/C |
| <i>B. melitensis</i>    | 1       |                         |                |                |                              |                               |   |                |                                    |                |   |                                   |                |                 |     |
|                         | 2       | L                       | +              | + <sup>e</sup> | -                            | -                             | +   | +              | -                                  | +              | - | -                                 | - <sup>e</sup> | +               | -   |
|                         | 3       |                         |                |                |                              |                               |   |                | +                                  | +              | - |                                   |                |                 |     |
| <i>B. abortus</i>       | 1       |                         |                |                |                              |                               | -   | +              | +                                  | -              | - |                                   |                |                 |     |
|                         | 2       |                         |                |                | +                            | +                             | -   | -              | +                                  | -              | - |                                   |                |                 |     |
|                         | 3       |                         |                |                |                              |                               | +   | +              | +                                  | -              | - |                                   |                |                 |     |
|                         | 4       | L                       | + <sup>e</sup> | +              |                              |                               | -   | + <sup>e</sup> | -                                  | +              | - | +                                 | +              | +               | -   |
|                         | 5       |                         |                |                | -                            | -                             | +   | +              | -                                  | +              | - |                                   |                |                 |     |
|                         | 6       |                         |                |                | -                            | -                             | +   | +              | +                                  | -              | - |                                   |                |                 |     |
| <i>B. suis</i>          | 9       |                         |                |                | +/-                          | +                             | +   | +              | -                                  | +              | - |                                   |                |                 |     |
|                         | 1       |                         |                |                |                              | +                             |   | - <sup>e</sup> | +                                  | -              | - |                                   |                |                 |     |
|                         | 2       |                         |                |                |                              | -                             |   | -              | +                                  | -              | - |                                   |                |                 |     |
|                         | 3       | L                       | +              | +              | -                            | -                             | +   | +              | +                                  | -              | - | -                                 | + <sup>e</sup> | + <sup>e</sup>  | -   |
|                         | 4       |                         |                |                |                              | -                             |   | - <sup>e</sup> | +                                  | +              | - |                                   |                |                 |     |
| <i>B. neotomae</i>      | 5       |                         |                |                |                              | -                             |   | -              | -                                  | +              | - |                                   |                |                 |     |
| <i>B. ovis</i>          |         | R                       | -              | -              | +                            | -                             | +   | - <sup>e</sup> | -                                  | -              | + | -                                 | -              | -               | +   |
| <i>B. canis</i>         |         | R                       | +              | +              | -                            | -                             | +   | - <sup>e</sup> | -                                  | -              | + | -                                 | -              | -               | +   |
| <i>B. ceti</i>          |         | L                       | +              | +              | -                            | -                             | +   | +              | +                                  | - <sup>e</sup> | - | + <sup>e</sup>                    | + <sup>e</sup> | + <sup>e</sup>  | -   |
| <i>B. pinnipedialis</i> |         | L                       | +              | +              | +                            | -                             | +   | +              | +                                  | - <sup>e</sup> | - | + <sup>e</sup>                    | + <sup>e</sup> | + <sup>e</sup>  | -   |
| <i>B. microti</i>       |         | L                       | +              | +              | -                            | -                             | +   | +              | -                                  | +              | - | -                                 | +              | +               | -   |
| <i>B. inopinata</i>     |         | L                       | +              | +              | -                            | +                             | +   | +              | +                                  | -              | - | -                                 |                |                 |     |

<sup>a</sup> Colonias lisas (O-PS completo en LPS de membrana)= L; Rugosas (O-PS ausente o defectuoso) =R

<sup>b</sup> Requerimiento de CO<sub>2</sub> para su crecimiento

<sup>c</sup> Producción de H<sub>2</sub>S

<sup>d</sup> Tb= Tbilisi, Wb= Weybridge, Iz<sub>1</sub>= Izatnagar, R/C. Resultados a una dilución rutinaria de la prueba (RTD)

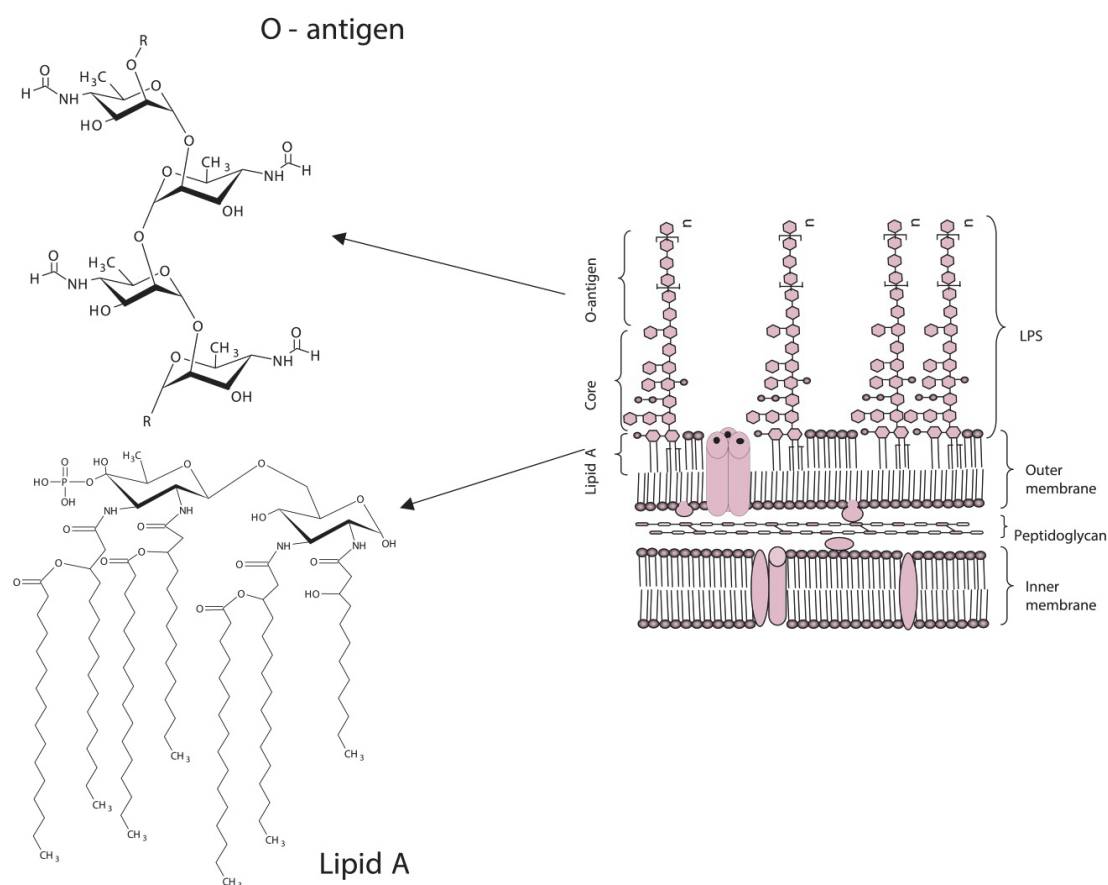
<sup>e</sup> Existen excepciones

<sup>f</sup> Aglutinación débil

## II.B. Características estructurales

La envoltura celular de *Brucella melitensis* se corresponde con la estructura típica de las bacterias Gram negativas (una membrana citoplasmática, un espacio periplásmico y una membrana externa) (Dubray y Plommet, 1976) (Figura II). El lipopolisacárido (LPS) es un componente estructural y funcional esencial para *Brucella* (Cardoso *et al.*, 2006) y constituye un importante factor de virulencia (Lapaque *et al.*, 2005) cuya estructura permite la diferenciación de las bacterias de este género en dos grupos: lisas (L-LPS: si contiene la cadena O completa, como por ejemplo *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) y rugosas (R-LPS: si dicha cadena es incompleta o ausente, como *B. ovis* y *B. canis*) (Baldwin y Goenka, 2006). A pesar de que esta diferenciación está ampliamente reconocida, la expresión simultánea de L-LPS y R-LPS ha sido descrita en *B. melitensis* (Bowden *et al.*, 1993). En la Figura II se ilustra la estructura química del L-LPS de *B. melitensis* constituido por el lípido A (formado por dos tipos de aminoglicosa, amidas y ácidos) (Moreno *et al.*, 1990), el

núcleo oligosacárido (que contiene glucosa, manosa, glucosamina y quinovosamina, entre otros azúcares) y un antígeno O en forma de cadenas laterales O-PS [formado por homopolímeros lineales de N-formil-perosamina unidos por dos tipos de enlace (que determinan la forma del LPS):  $\alpha$ -1,2 (mayoritario en las cepas epítipo dominante A) o tipo  $\alpha$ -1,3 (en mayor proporción en cepas epítipo dominante M)] (Bundle *et al.*, 1989; Caroff *et al.*, 1984).



**Figura II.** Esquema sobre la estructura de la pared bacteriana de *Brucella melitensis* incluyendo la composición química del O-PS y lípido A del L-LPS. Imagen de Cardoso *et al.*, 2011 (Cardoso *et al.* 2006) (Microbial Cell Factories 2006; 5)

Existe un alto grado de similitud entre el LPS de *Brucella* (denominado como 'LPS no clásico') y el que presentan otras bacterias Gram negativas ('LPS clásico') como *Escherichia coli* O:116, *E. coli* O:157, el grupo N (O:30) de *Salmonella*, *Vibrio cholerae* O:1 y, sobre todo, *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel, 1985b; Morse *et al.*, 1953). Las diferencias entre el LPS clásico y no clásico conllevan variaciones en ciertas propiedades de estas bacterias [capacidad de inducción de citoquinas como

el interferón (IFN) y el factor de necrosis tumoral (TNF), capacidad pirógena, etc.] (Keleti *et al.*, 1974; Lapaque *et al.* 2005; Moreno *et al.*, 1981). Debido a la similitud entre el LPS de *Brucella* y el de algunas enterobacterias, existe un importante problema de interferencia diagnóstica cuando se emplean técnicas serológicas basadas en la detección de anticuerpos frente a este LPS de *Brucella* (considerado el antígeno inmunodominante en la respuesta serológica del hospedador frente a *B. melitensis*) (Morse *et al.* 1953; Nielsen *et al.*, 2006). El L-LPS está constituido por varios determinantes antigénicos entre los que destacan los epítomos A y M que están presentes en diferente proporción en las cepas lisas de *Brucella*. La aglutinación de las cepas de *Brucella melitensis* con anticuerpos dirigidos contra estos epítomos A y M del LPS permite la división de esta especie bacteriana en tres biovariedades (1, 2 y 3) (Wilson y Miles, 1932) (Tabla 1). En algunas ocasiones la diferenciación de los biovars 2 y 3 resulta complicada debido al empleo de sueros monoespecíficos de limitada capacidad discriminatoria y a la disociación de los cultivos de *B. melitensis* en formas rugosas (Alton, 1990; Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001). Al contrario que en *B. suis* (Whatmore, 2009), no existen diferencias evidentes en la epidemiología de los distintos biovars de *B. melitensis* (como la preferencia de hospedador) ni en la clínica a la que dan lugar (Blasco, 2010a; Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001). La existencia de epítomos (C y C/Y) comunes en los serotipos A y M (Douglas y Palmer, 1988), evidenciada por el empleo de anticuerpos monoclonales (Weynants *et al.*, 1997), del L-LPS de *Brucella* explica las reacciones cruzadas entre estos serotipos (Alonso-Urmeneta *et al.*, 1998). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales del epítomo C del LPS muestran una ausencia de reacción cruzada con *Y. enterocolitica* O:9 (Palmer y Douglas, 1989) convirtiéndolos en un elemento específico de las cepas lisas de *Brucella*.

Otros componentes importantes de la envoltura celular de *B. melitensis* son las proteínas de membrana, los antígenos citosólicos y el hapteno nativo (HN) (Cloekaert *et al.*, 1996b; Cloekaert *et al.*, 2002b; Gamazo *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 2011; Zygmunt *et al.*, 1994a). El HN posee una estructura química muy similar al O-PS de *Brucella* (Moreno *et al.*, 1987). El interés sobre este componente se debe a su potencial utilidad como diana diagnóstica para la diferenciación de animales vacunados e infectados por cepas lisas de *Brucella* ya

que, después de un tiempo suficiente tras a vacunación, sólo se detectarían anticuerpos frente al HN de las cepas de campo (Blasco *et al.*, 1984a; Diaz *et al.*, 1984). Por otro lado, la alta especificidad de las proteínas del género *Brucella* (Diaz *et al.*, 1968), las ha convertido en objeto de interés para el desarrollo de técnicas específicas para el diagnóstico de *B. melitensis*. A pesar de ello, se ha sugerido la posibilidad de la existencia de reacciones cruzadas con proteínas de *Ochrobactrum anthropi* (Velasco *et al.*, 1997), lo que se debería tener en consideración para la interpretación de los resultados de las técnicas diagnósticas basadas en proteínas de membrana externa. La fosfatidilcolina (lecitina) es el principal fosfolípido de la membrana externa de los miembros del género *Brucella* (Gorvel, 2008; Roop *et al.*, 2009), estando probablemente implicado en su virulencia. Entre los constituyentes del periplasma de *Brucella* destaca el glucano cíclico que desarrolla un importante papel en la osmorregulación y supervivencia bacterina (Gorvel, 2008).

## II.C. Características genéticas

La secuencia del genoma completo de *B. melitensis* se obtuvo por primera vez en 2002 (DelVecchio *et al.*, 2002b), y desde entonces se han secuenciado múltiples cepas (Ding *et al.*, 2011; Ke *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Shome *et al.*, 2013; Wattam *et al.*, 2009) revelando, por ejemplo, información interesante sobre los mecanismos de virulencia. El genoma de *B. melitensis* 16M [cepa de referencia del biovar 1 de *B. melitensis* aislada en ganado caprino en EE.UU. (Meyer y Morgan, 1973)] tiene un tamaño medio de 3.294.931 pb y está dividido en dos cromosomas circulares: el cromosoma I (de aprox. 2,11 Mb) y el cromosoma II (de aprox. 1,18Mb) (DelVecchio *et al.*, 2002a). En la última década se ha completado también la secuenciación del genoma de diferentes cepas de *B. abortus* (Halling *et al.*, 2005) y *B. suis* (Paulsen *et al.*, 2002), poniendo de manifiesto que *B. melitensis* comparte más fragmentos con *B. abortus* que con *B. suis* (Christopher *et al.*, 2010), lo que refuerza la teoría de la existencia de un ancestro común para *B. melitensis* y *B. abortus* que sería diferente del de *B. suis* (Chain *et al.*, 2005). De cualquier forma, las tres especies presentan un grado de diversidad genética muy limitado (Halling *et al.*, 2005). A pesar de este elevado grado de homología de ADN se han desarrollado diferentes herramientas moleculares para la identificación de distintas regiones genéticas [por ejemplo el gen *omp2* (Vizcaíno *et al.*, 2000) y la secuencia de inserción

IS711 (Ouahrani-Bettache *et al.*, 1996; Ouahrani *et al.*, 1993; Zygmunt *et al.*, 2010)] que permiten la diferenciación de las especies de *Brucella* (Whatmore, 2009). En el caso de *B. melitensis* se han descrito una serie de dianas, como el locus *dnaK* (Cloeckaert *et al.*, 1996c), que permiten su identificación específica.

### III. BRUCELOSIS OVINA Y CAPRINA

Si bien diferentes especies de *Brucella* como *B. suis* (Lucero *et al.*, 2008; Paolicchi *et al.*, 1993), *B. abortus* (Lilenbaum *et al.*, 2007) y *B. ovis* (Buddle, 1956; Burgess *et al.*, 1985) pueden afectar a los pequeños rumiantes, *B. melitensis* ha sido y sigue siendo el principal agente etiológico de la brucelosis ovina y caprina (OIE, 2009b). Por ello en la presente memoria, la brucelosis causada por *B. melitensis* será referida como brucelosis de los pequeños rumiantes o brucelosis ovina y caprina (BOC).

#### III.A. Patogenia, sintomatología, vías de transmisión y rango de hospedadores de *B. melitensis*

A pesar de que la patogenia (y la consiguiente RI del hospedador y sintomatología desarrollada) causada por *B. melitensis* puede variar en función de diversos factores dependientes del patógeno (especie, cepa, dosis, vía de infección) y del hospedador (especie, edad, sexo, estado fisiológico, inmunización previa, etc.) (Adams, 2002; Nicoletti, 1990a; Poester *et al.*, 2013), la patogenia causada por *B. melitensis* en los pequeños rumiantes es considerada muy similar a la de *B. abortus* en el ganado bovino (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

Las principales vías de contagio de *B. melitensis* en los pequeños rumiantes son la vía oral (a través de las mucosa orofaríngea), la vía respiratoria (mucosa del tracto respiratorio superior), la vía percutánea y la vía conjuntival a partir del contacto con material contaminado (principalmente fetos, placenta, descargas vaginales etc. derivados del aborto infeccioso) (Alton, 1990). La vía venérea, al contrario que en



otras especies de este género, parece jugar un papel secundario en la transmisión de *B. melitensis* en la monta natural (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001), aunque se ha demostrado su presencia en el semen de animales infectados (se ha observado que alrededor del 20% de los carneros seropositivos excretan esta bacteria en semen) (Blasco, 2004). La transmisión pseudo-vertical de *B. melitensis* se produce principalmente durante la lactación a partir de madres infectadas que excretan la bacteria en leche o calostro (Grillo *et al.*, 1997; Tittarelli *et al.*, 2005a). En menor proporción también se puede producir una transmisión vertical a través de la placenta epiteliocorial -típica de los rumiantes (Díaz-Aparicio y Díaz, 2013). Ambas situaciones conllevan la aparición de animales infectados de manera latente en el rebaño (Blasco 2010a; Díaz-Aparicio y Díaz, 2013) (que suponen aproximadamente un 10% de los descendientes de madres infectadas) (Blasco, 2010b) representando una potencial fuente de infección para otros individuos susceptibles. Algunos de estos animales podrían permanecer seronegativos (Alton, 1990; Tittarelli *et al.* 2005a), incluso hasta el primer parto o aborto (World Health Organisation *et al.*, 2006), pasando desapercibidos a las pruebas serológicas de los programas de lucha contra BOC, lo que hace que sea aconsejable el sacrificio de los descendientes de hembras infectadas (Díaz-Aparicio y Díaz, 2013).

Aunque la entrada de *B. melitensis* en los rebaños de pequeños rumiantes puede ocurrir de diversos modos, las dos más característicos en la epidemiología de BOC son: i) la introducción de animales infectados en un rebaño y ii) el uso común de pastos, granjas, material, etc. contaminados con *B. melitensis* (Duran-Ferrer y Paramio, 2005) (de manera general, se considera que la infección a partir de agua circulante es rara y sólo es efectiva en cortas distancias al punto de infección) (Samartino *et al.*, 2005). Los pequeños rumiantes infectados sólo son una fuente de infección durante el periodo de excreción de *B. melitensis* (Alton, 1990), siendo las principales de fuentes de infección:

- Fetos/mortinatos/nacidos no viables y anexos fetales producto del fallo reproductivo. Se consideran los elementos potencialmente más contaminados (hasta  $10^{10}$  - $10^{13}$  UFC/gramo de tejido) (Crespo, 1994; Poester *et al.*, 2013; Rodríguez Ferri y Crespo, 2000;).

- Excreción vaginal y leche/calostro. Su importancia está condicionada a la especie animal: en cabras, en las que *B. melitensis* puede aislarse de los exudados vaginales antes del parto (Poester *et al.*, 2013), es típico que la excreción bacteriana en leche se repita en lactaciones posteriores y las secreciones vaginales suelen estar ampliamente contaminadas durante largos periodos de tiempo [de 2-3 meses (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001) e incluso hasta un año (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000)]. Sin embargo, en ovejas es raro aislar la bacteria en leche en parideras posteriores a la del fallo reproductivo (Alton, 1990). Aproximadamente el 80% de las ovejas seropositivas a *Brucella* eliminan este patógeno en leche (aprox.  $10^5$  UFC/mL) (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). La excreción vaginal en el ganado ovino (a menudo observada tan sólo en el 50% de los reactivos) (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000) es también más limitada que en las cabras (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001). Esta diferenciación ha de ser considerada como una generalización, ya que existen estudios que demuestran una dilatada persistencia de la excreción vaginal y/o en leche durante dos o tres gestaciones posteriores al aborto brucelar en ganado ovino (Tittarelli *et al.*, 2005a). Si la infección se establece de manera permanente en la glándula y/o linfonodos mamarios se puede producir una excreción constante o intermitente a través de la leche, lo que también favorecerá la diseminación y transmisión de *Brucella*. Se considera que aproximadamente en el 80% de los rumiantes infectados, la bacteria permanece localizada en la glándula mamaria y linfonodo supramamario (Blasco, 2010b; Hamdy y Amin, 2002).
- Semen. Se ha puesto de manifiesto que los carneros pueden estar infectados con *B. melitensis* y sufrir la enfermedad (sobre todo orquitis y epididimitis) (Chand *et al.*, 2002; Musa y Jahans, 1990). Considerando toda esta información y la excreción de este agente patógeno por vía vaginal en hembras infectadas, se debe considerar que la monta puede suponer un riesgo para la infección de animales no infectados (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000).

- Orina, heces, secreción nasal. La posible excreción por dichas vías las convierte en posibles fuentes de infección que se deben considerar en el control de esta enfermedad, aunque de manera secundaria (Alton, 1990).

La vía de entrada más importante en los pequeños rumiantes es la mucosa oral (Poester *et al.*, 2013), aunque las células M del intestino también han sido identificadas como una posible vía de acceso para *B. melitensis* (Paixao *et al.*, 2009). La respuesta inmune contra *B. melitensis* cuando ésta invade el sistema digestivo tiene un impacto limitado en su viabilidad (Paixao *et al.*, 2009) posiblemente debido a la acción de la propia bacteria (inhibiendo la secreción de citoquinas, la presentación de antígenos, etc.) (Gorvel y Moreno, 2002). Una vez ha alcanzado el interior del hospedador, *B. melitensis* (opsonizada y no opsonizada) (Eze *et al.*, 2000) suele localizarse en el interior de fagocitos mononucleares y polimorfonucleares localizados en la submucosa. La opsonización mediada por anticuerpos tiene un escaso impacto en la supervivencia intracelular de la bacteria (Baldwin y Goenka, 2006). Muchos de los mecanismos de virulencia de *Brucella* son aún desconocidos (Ficht, 2002) aunque se sabe que el LPS juega un importante papel en su supervivencia en el interior del hospedador previniendo la activación de la vía alternativa del complemento (Lapaque *et al.* 2005), la lisis mediada por complemento (se ha propuesto que las cepas rugosas de *Brucella* podrían presentar una menor capacidad de supervivencia debido a que poseen el O-PS defectuoso) (Allen *et al.*, 1998; Godfroid *et al.*, 1998), la acción de ciertos compuestos con actividad antimicrobiana como la lactoferrina (Martínez de *et al.*, 1995) y la inducción de citoquinas inflamatorias (como TNF- $\alpha$ ) y óxido nítrico sintetasa (Jiménez de Bagues *et al.*, 2004). Cuando los mecanismos inmunitarios del hospedador consiguen destruir las bacterias, el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II presenta los péptidos en la superficie celular estimulando la RI del hospedador (el LPS ) (Díaz-Aparicio y Díaz, 2013).

El éxito como patógeno de *Brucella* radica en su capacidad de supervivencia y multiplicación en el hospedador alterando el sistema inmune y metabolismo del mismo con el fin de asegurar su subsistencia (Adams, 2002) lo que determina su patogenia, la RI inducida en el hospedador y su capacidad para producir infecciones crónicas (Roop *et al.*, 2009). Estos microorganismos pueden sobrevivir en el interior de células fagocíticas y no fagocíticas (epiteliales, trofoblastos placentarios, células

dendríticas y macrófagos) (Gorvel, 2008; Roop *et al.* 2009). Una vez se ha unido a células fagocíticas no profesionales, *B. melitensis* es internalizada mediante un proceso de fagocitosis mediada por receptores (Detilleux *et al.*, 1990), posiblemente activado por la propia bacteria, y cambios en el citoesqueleto de la célula hospedadora (Guzmán-Verri *et al.*, 2001) (mediados por el sistema de regulación BvrR/BvrS) (López-Goni *et al.*, 2002). Aproximadamente el 90% de las bacterias son destruidas en el interior de macrófagos y células dendríticas (Skendros y Boura, 2013). Algunos investigadores han sugerido que *B. melitensis* podría promover el fenómeno de autofagia en los macrófagos infectados (Guo *et al.*, 2012). En el interior de la célula hospedadora estas bacterias se ubican en el retículo endoplásmico rugoso (RER) donde se multiplican siempre de una forma ‘silenciosa’ (sin interrumpir el ciclo y funciones celulares) e inhibiendo la apoptosis celular (Detilleux *et al.*, 1990; Ficht y Adams, 2009), seguramente mediado por la cadena O del LPS (Jiménez de Bagues *et al.*, 2004). A pesar de que los motivos del tropismo de *Brucella* por el RER son desconocidos, algunos autores han propuesto que la disponibilidad de metabolitos presente en este orgánulo sería un atractivo reclamo para esta bacteria (Gorvel y Moreno, 2002).

El Sistema de Secreción Tipo IV (T4SS), codificado por el locus *virB* (Sieira *et al.*, 2004), tiene un papel fundamental en la evasión de la fusión con los lisosomas (permitiendo su persistencia en el RER) (Celli *et al.*, 2003). El entorno donde sobrevive *Brucella* es ácido debido a la activación de la bomba de protones ATPasa (Arenas *et al.*, 2000) lo que evita la acción de muchos antibacterianos (Pappas y Papadimitriou, 2007) facilitando su supervivencia intracelular.

A través de la vía linfática, el patógeno localizado en el interior de los macrófagos consigue alcanzar el linfonodo más cercano al punto de entrada (Ficht y Adams, 2009). Cuando la replicación de *B. melitensis* no es controlada por el hospedador, la bacteria destruye la célula hospedadora e invade otras células donde se replica de nuevo (también puede multiplicarse extracelularmente en el interior del hospedador) (Purcell *et al.*, 2008). De este modo, cuando *Brucella* sobrepasa las defensas del hospedador, pasa a la circulación sanguínea produciéndose una fase de bacteremia de duración variable (en función de la vía de entrada, dosis infectiva, etc.) invadiendo preferencialmente el sistema reproductivo y reticuloendotelial (Ficht y

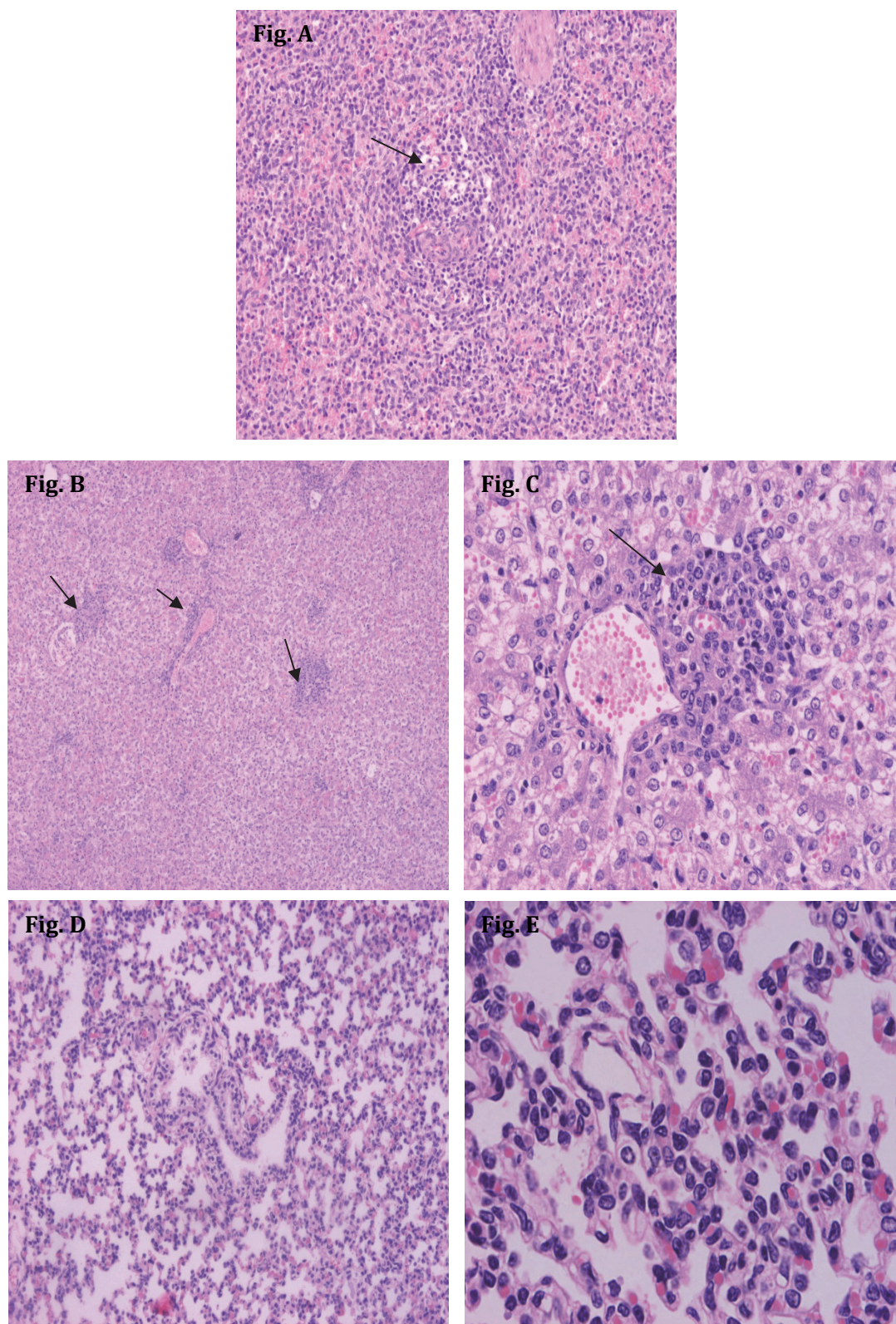
Adams, 2009) en función de diferentes factores del hospedador (como el estado reproductivo, la especie o la edad).

Los individuos más susceptibles a la infección por *B. melitensis* son las hembras gestantes; de hecho, este patógeno tiene tropismo por la placenta invadiendo los trofoblastos eritrofagocíticos de los placentomas y los trofoblastos corioalantoideos donde produce necrosis, vasculitis y otras lesiones que resultan en la separación de los trofoblastos y epitelio uterino (Anderson *et al.*, 1986) dando lugar al principal signo clínico de esta patología, la aparición de abortos (generalmente durante los dos últimos meses de gestación) (Alton, 1990) o nacidos débiles (Alton, 1985b). Se ha relacionado el tropismo de esta bacteria por el útero de los rumiantes con la alta concentración de eritritol presente en este órgano (Keppies *et al.*, 1965). Sin embargo, esta bacteria también se ha aislado de úteros de especies animales como roedores en los que la concentración de esta hormona es baja (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000).

Además *B. melitensis* puede invadir diferentes órganos parenquimatosos y otros tejidos dando lugar a diversos síntomas. Las lesiones causadas por *B. melitensis* en los diferentes tejidos y órganos no son patognomónicas (por ejemplo, en los ganglios linfáticos puede causar lesiones granulomatosas) (Adams 2002; Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001) lo que dificulta el diagnóstico de esta enfermedad.

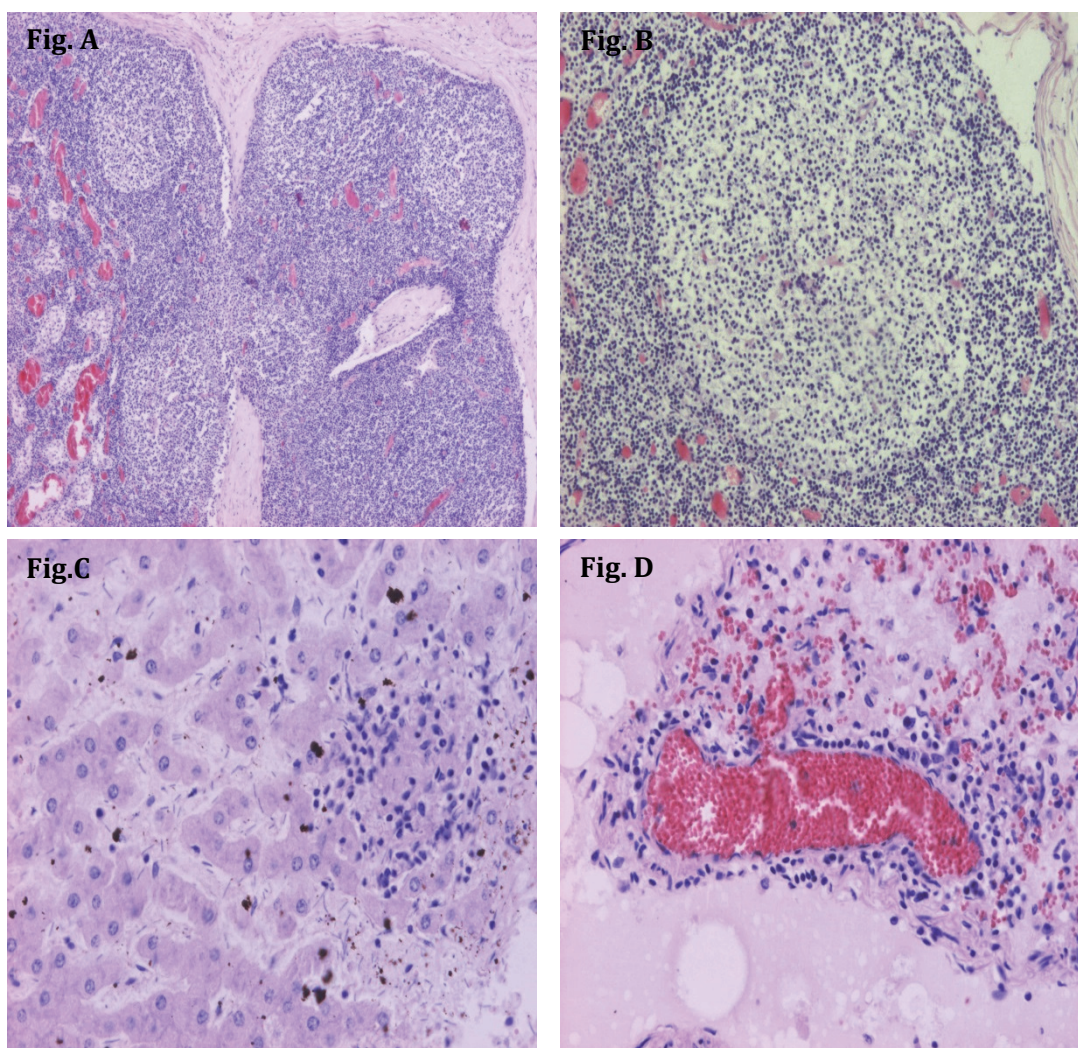
La infección por *B. melitensis* también puede dar lugar a nacidos viables o abortos en los que no se puede aislar el agente causal (Alton, 1990). Los fetos abortados pueden presentar ascitis y/o hidrotórax sanguinolento, esplenomegalia, hepatomegalia, lesiones necrotizantes en cotiledones que se tornan de un color grisáceo y aspecto pastoso (Enright, 1990; Poester *et al.*, 2013; Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001) (Figura III). Cuando la infección se establece en otros órganos este patógeno puede causar placentitis necrotizante, lesiones necrotizantes en testículos, epidídimo y glándulas anejas que evolucionan a granulomas, etc. (Figuras IV y V), dando lugar a una sintomatología variada (orquitis, epididimitis, artritis y metritis) cuando *Brucella* infecta testículos, epidídimo, articulaciones y útero, respectivamente (Adams, 2002; Alton, 1990).



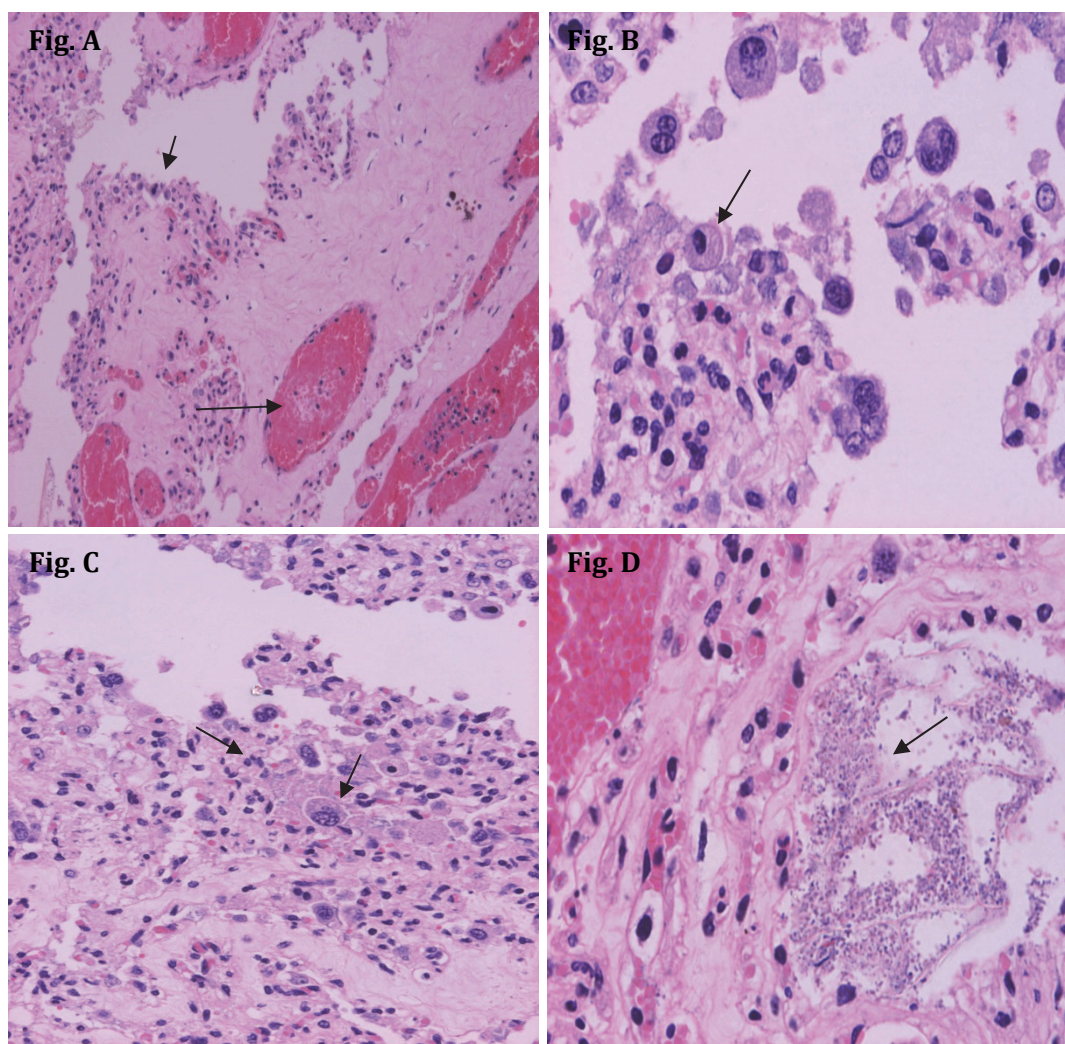


**Figura III.** Cortes histológicos teñidos mediante el método de Hematoxilina-Eosina convencional. Las imágenes muestran cortes histológicos de diferentes órganos de fetos abortados debido a una infección con *B. melitensis*. Los órganos linfoides estudiados (bazo, ganglios mediastínicos, retrofaríngeos y mesentéricos) mostraban un fenómeno de activación de los folículos linfoides en los que además se podía apreciar una depoblación celular en el centro germinal (depleción linfoide) sustituida por detritus celulares y activación de células reticulares y la práctica ausencia de linfoblastos más evidente en la pulpa (Fig. A. Bazo; Fig. B y C. Hígado; Fig. D y E. Pulmón).





**Figura IV.** Cortes histológicos teñidos mediante el método de Hematoxilina-Eosina convencional. Las imágenes muestran cortes histológicos de diferentes órganos con lesiones causadas por una infección con *B. melitensis* en ovejas preñadas. Se observa una evidente activación del tejido linfoide consistente en una hiperplasia folicular marcada (Fig. A) de los ganglios linfoides con marcada depleción linfoide del centro germinal (Fig. B). El resto de los órganos muestran infiltrados de células redondas con predominio perivascular se puede apreciar en hígado (Fig. C) y pulmón (Fig. D).



**Figura V.** Cortes histológicos teñidos mediante el método de Hematoxilina-Eosina convencional. Las imágenes muestran cortes histológicos de diferentes órganos con lesiones causadas por una infección con *B. melitensis* en ovejas preñadas. La placenta de estos animales muestra una inflamación intensa consistente en una placentitis necrotizante (Fig. A) o hemorrágica en algunos casos. En todos los casos se aprecian cambios degenerativos y necróticos en el área trofoblástica de la membrana corioalantoidea y la parte terminal de los cotiledones. En algunas áreas se observa la necrosis superficial del epitelio trofoblástico (Fig. B) que a veces se extiende al tejido conjuntivo subyacente (ulceración corioalantoidea). El tejido intercotiledonario de la zona presenta imágenes necróticas similares. En la mayoría de los casos se aprecian grandes colonias de bacterias (Fig. C) acompañadas de una infiltración de macrófagos y neutrófilos (Fig. D).



La Figura VI esquematiza el ciclo biológico de *B. melitensis* que se explica en la presente sección.

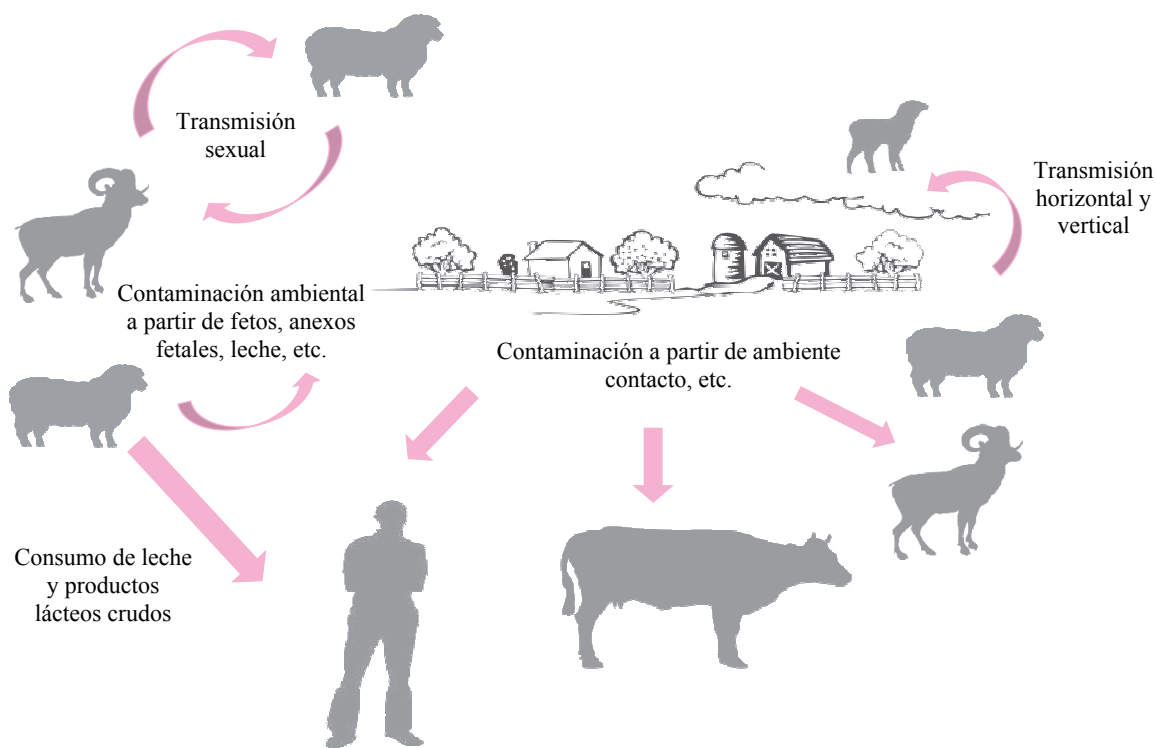


Figura VI. Ciclo biológico de *B. melitensis*

Aunque, como se ha observado en el modelo murino, la RI frente a *Brucella* está supeditada a una serie de variables como el estado fisiológico del hospedador o la virulencia de la cepa infectiva (Grillo *et al.*, 2012), en líneas generales se puede afirmar que la infección provoca una RI mayoritariamente de tipo celular (Skendros y Boura, 2013), si bien la RI serológica juega también un papel relevante en la lucha contra este patógeno (Montaraz y Winter, 1986). La respuesta serológica es muy variable, llegando a poder pasar desapercibida cuando *B. melitensis* infecta animales sexualmente inmaduros o en hembras preñadas hasta el momento del aborto/parto (World Health Organisation, Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Organization for Animal Health, 2006). La RI humoral está mayoritariamente inducida por el LPS de membrana de *B. melitensis* (Jiménez de Bagues *et al.*, 1992). Se ha observado que los anticuerpos producidos contra las proteínas de membrana tienen un bajo poder protector contra la infección por *B. melitensis* (Cloeckaert *et al.*, 1991) debido posiblemente a que la mayoría de estas proteínas quedan ocultas por

el LPS (Cloekaert *et al.* 2002b) que es el antígeno más expuesto en la superficie de *B. melitensis* (Bowden *et al.*, 1995; Cloekaert *et al.*, 1990).

La respuesta serológica se inicia aproximadamente dos semanas después de la infección, protagonizada en fases iniciales por inmunoglobulinas (Ig) M y en una segunda fase por IgG (Alton, 1990; Nicoletti, 1990b). En fases más tardías se producirán IgA (en menor proporción y de manera irregular) (Nielsen *et al.*, 1984). En estados más crónicos de infección las IgG se convertirán en el isotipo predominante en el hospedador (Alton, 1990). Las IgMs son las principales responsables de los falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otras bacterias (Corbel, 1985b) y las IgGs son el principal tipo de anticuerpo reconocido por la mayoría de las pruebas serológicas (Nielsen *et al.*, 2005b). Los anticuerpos, el complemento y algunas citoquinas (diferentes de IFN- $\gamma$ ) producidas por células NK (*Natural Killers*) podrían desarrollar un papel complementario en la lucha contra *Brucella* en las primeras fases de infección o en la multiplicación extracelular de la bacteria (Purcell *et al.*, 2008).

La RI celular es mayoritariamente de tipo Th1 (liderada por macrófagos y linfocitos T) (Skendros y Boura, 2013) y está protagonizada principalmente por el interferón tipo gamma (IFN- $\gamma$ ) que juega un papel esencial en el control de *Brucella* (Jiang y Baldwin, 1993; Zhan *et al.*, 1993; Zhan y Cheers, 1993). Esta citoquina Th1 está principalmente producida por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Weynants *et al.*, 1998) aunque también se ha demostrado la participación de CD5<sup>+</sup> en su producción (Suraud *et al.*, 2008). Estudios *in vitro* han demostrado que el IFN- $\gamma$  estimula la activación de los macrófagos promoviendo la producción de especies reactivas de oxígeno (Jiang *et al.*, 1993), entre otros mecanismos celulares. La RI celular se desencadena principalmente por la acción de proteínas de *Brucella* (Oliveira *et al.*, 2002) y al igual que en el caso de la respuesta serológica, es variable y puede no ser detectada (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

Las ovejas y las cabras son los principales hospedadores de *B. melitensis*. Este agente patógeno puede infectar a individuos de todas las edades aunque únicamente causa enfermedad en adultos sexualmente maduros (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001). Todas las razas de cabras se

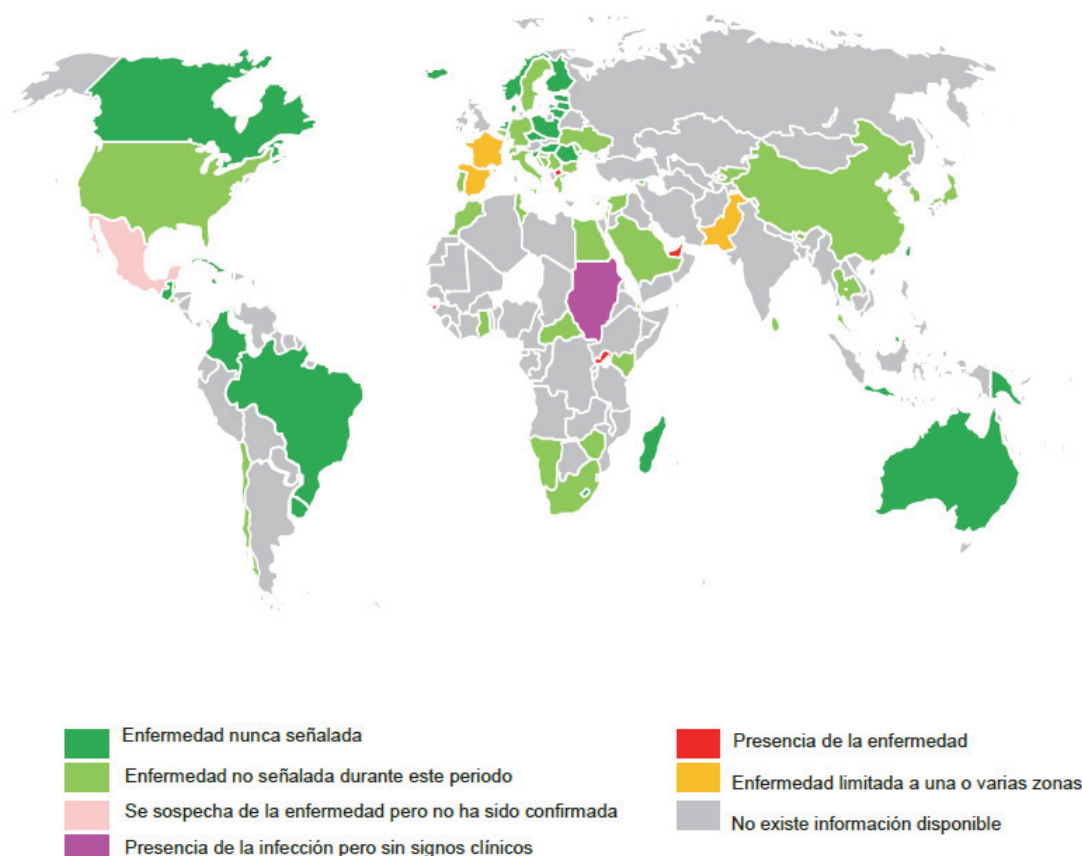
consideran susceptibles a la infección por *B. melitensis*. Sin embargo, en el caso del ganado ovino se han observado importantes diferencias asociadas a este factor: las razas de leche así como aquellas de 'cola grasa' del Sureste Asiático y Mediterráneo se consideran más susceptibles a la infección que aquéllas de aptitud cárnica, de raza Maltesa y típicas de América del Sur (Alton, 1987; Alton, 1990). Tras la recuperación de la infección por *B. melitensis*, las ovejas suelen ser resistentes a infecciones posteriores (Alton, 1990). Las corderas nacidas de madres infectadas procedentes de rebaños crónicamente infectados suelen abortar con menos frecuencia que aquéllas infectadas en rebaños sin historial de brucelosis (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

*B. melitensis* se considera el miembro del género con menor especificidad de hospedador dado su gran poder de adaptación a diferentes especies (incluyendo no sólo mamíferos sino también ocasionalmente animales de sangre fría como *Clarias gariepinus*) (el-Tras *et al.*, 2010). Así, *B. melitensis* ha sido aislada de diferentes especies de ganado, incluyendo vacas (Kahler, 2000; Verger *et al.*, 1989), cerdos (Borts *et al.*, 1946), camellos (Godfroid, 2002; Radwan *et al.*, 1992) y búfalos (Refai, 2002). La presencia de este patógeno en el ganado bovino se ha descrito en países europeos de la cuenca mediterránea, Israel, Arabia Saudí y Kuwait en los últimos años (Corbel, 1997; Samaha *et al.*, 2008). La carencia de conocimientos sobre la epidemiología de *B. melitensis* en el ganado bovino (Godfroid y Kasbohrer, 2002; Godfroid *et al.*, 2005) unido a la ausencia de medidas profilácticas y de control de eficacia ampliamente demostrada dificultan el manejo de esta enfermedad (Blasco y Molina-Flores, 2011). La infección de ganado bovino por *B. melitensis* suele estar asociada a la presencia de pequeños rumiantes infectados (Alton, 1990). Por tanto, parece probable que el control de la brucelosis causada por *B. melitensis* en bovino pueda lograrse mediante el control de este patógeno en los pequeños rumiantes (Godfroid y Kasbohrer, 2002). *B. melitensis* no suele causar tormentas de abortos en el ganado bovino aunque puede ser excretada a través de las ubres, por lo que la leche de vaca podría constituir una fuente de infección para sus crías e, incluso, para el hombre (Alton, 1990). Los camélidos también han sido reconocidos como una posible causa de brucelosis humana (Abbas y Agab, 2002; Cooper, 1992; Refai 2002; The Center for For Food Security and Public Health, 2009).

Además *B. melitensis* puede infectar otras especies animales como perros y gatos que viven en explotaciones con rebaños infectados, pudiendo actuar adicionalmente como vectores mecánicos de este agente (Hinic *et al.*, 2010; Mikolon *et al.*, 1998; Samadi *et al.*, 2010; Seleem *et al.*, 2010). Se ha descrito la presencia de *B. melitensis* en garrapatas (*Ornithodoros*) e insectos (*Stomoxys calcitrans*) aunque su relevancia en la epidemiología de la enfermedad no parece ser decisiva (Alton, 1990; Rodríguez Ferri y Crespo, 2000)

La infección por este agente zoonótico se ha detectado también en algunas especies de vida libre como el íbice (*Capra ibex*) (Ferroglio *et al.*, 1998), el rebeco (*Rupicapra rupicapra*) (Garin-Bastuji *et al.*, 1990), el órice (*Oryx*) (Ostrowski *et al.*, 2002), el antílope negro (*Hippotragus niger*) (M. McFarlane, 2005, datos no publicados, citado en Godfroid *et al.*, 2013b) y el impala (*Aepyceros melampus*) (Schiemann y Staak, 1971). La importancia de la fauna salvaje en la transmisión de *B. melitensis* se debe a su potencial papel como fuente de infección para humanos (en especial cazadores) y animales domésticos (Pappas, 2010). Sin embargo, en el caso de BOC, las especies salvajes parecen jugar un papel más limitado que el observado en la epidemiología de otras especies zoonóticas de *Brucella* (Godfroid 2002; Godfroid *et al.* 2013b) [como, por ejemplo, el papel que desempeñan los alces en la transmisión de *B. abortus* en el área de Yellowstone en EE.UU. (Higgins *et al.*, 2012) y, sobre todo, los jabalíes en la epidemiología de *B. suis* (Stoffregen *et al.*, 2007)]. Varios estudios realizados en España han demostrado que los rumiantes salvajes presentan una baja seroprevalencia de brucelosis, por lo que tampoco parecen jugar un papel esencial en la transmisión de *B. melitensis* (Gortázar *et al.*, 2007; López-Olvera *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2010) aunque es aconsejable mantener una vigilancia, sobre todo en aquellas zonas donde se realiza un manejo artificial de esta fauna salvaje que pueda conllevar ciertas situaciones epidemiológicas (fundamentalmente densidades elevadas) que favorezcan la transmisión del patógeno desde fauna salvaje a ganado doméstico como se ha observado recientemente en Francia (Mick *et al.*, 2014).

La Figura VII recoge la situación sanitaria mundial con respecto a la brucelosis causada por *B. melitensis* en animales de vida libre durante el primer semestre de 2013 (en aquellos países cuya información no estaba disponible para este periodo, se ha indicado la información más reciente disponible) ([www.oie.int](http://www.oie.int)).



**Figura VII.** Situación mundial respecto a *B. melitensis* en animales salvajes durante el primer semestre de 2013 (en aquellos países sin datos para este periodo se ha reflejado la información disponible más reciente). Este mapa ha sido construido con la información de *World Animal Health Information Database (WAHID) Interface* (OIE) [www.oie.int](http://www.oie.int).

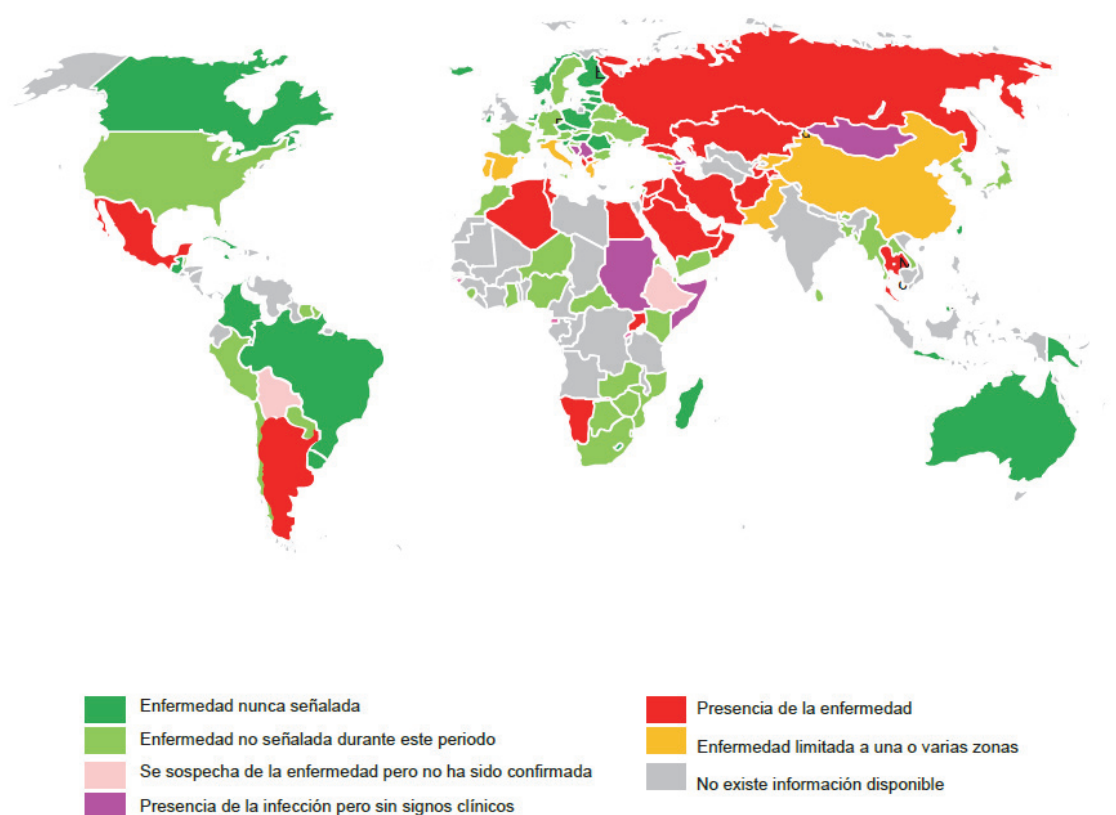
### III.B. Distribución geográfica

Es precisamente el Mediterráneo (lugar en el que *B. melitensis* fue descrita por primera vez) el principal escenario donde tradicionalmente se ha emplazado este patógeno, si bien su distribución es prácticamente mundial (este de Asia y Asia central, Golfo Árabe y algunos países de América Latina y África) (Ficht y Adams,

2009). En la Figura VIII se puede apreciar la situación sanitaria con respecto a la brucelosis causada por *B. melitensis* de cada país durante el primer semestre de 2013 (en aquellos países cuya información no estaba disponible para este periodo, se ha indicado la información más reciente disponible) ([www.oie.int](http://www.oie.int)). Algunos autores han resaltado la necesidad de realizar estudios de seroprevalencia de brucelosis en muchos países donde los datos están desfasados o ausentes con el fin de conocer la situación actual de esta enfermedad en todo el mundo y evaluar el éxito de las medidas aplicadas para su control (Gwida *et al.*, 2010).

Crespo (Crespo, 1994) esquematiza el mapa de zonas afectadas por la BOC en tres escenarios (a menudo superpuestos): i) áreas con condiciones geográficas y climatológicas hostiles donde predomina la ganadería de pequeños rumiantes, ii) áreas desfavorecidas donde los recursos son muy limitados y iii) áreas con un verdadero problema sanitario (en animales y humanos) causado por *B. melitensis*.

Ciertas regiones geográficas como América del Norte (exceptuando México), el norte y centro de Europa y sureste de Asia parecen ser territorios libres de BOC (OIE, 2009b), y también existen países (Canadá o Brasil) en los que la enfermedad no se ha descrito nunca. Alton (Alton, 1987) estableció una asociación entre el incremento observado en la brucelosis de los pequeños rumiantes (y, consecuentemente, la brucelosis humana) en muchos países de Oriente Próximo y la intensificación de los sistemas de producción tradicionales (consecuencia de la industrialización del sector). Existen países en los que la enfermedad ha sido tradicionalmente considerada endémica y donde actualmente continúa siendo un problema [en las fases iniciales de su control (Egipto) o bien en estadios próximos a la erradicación como es el caso de nuestro país]. En otras regiones (zonas de los Balcanes y este de Europa) (FAO, 2009) la BOC ha re-emergido en los últimos años (a menudo asociada a cambios políticos y sociales que han alterado los sistemas de control ganadero y/o han puesto de manifiesto un posible infra-diagnóstico (o infra-comunicación) de la enfermedad durante el régimen político anterior) (Pappas, 2010).



**Figura VIII.** Situación mundial respecto a *B. melitensis* en animales domésticos durante el primer semestre de 2013 (en aquellos países sin datos para este periodo se ha indicado la información disponible más reciente). Este mapa ha sido construido con la información de *World Animal Health Information Database (WAHID) Interface* (OIE) [www.oie.int](http://www.oie.int)

Actualmente, la BOC es una enfermedad prácticamente controlada en países desarrollados donde las medidas de control se han aplicado de manera efectiva, situación que dista mucho de la observada en países en vías de desarrollo. De hecho, Godfroid *et al.* (Godfroid *et al.*, 2005) señalaron: '*Básicamente, en los países en desarrollo la brucelosis está casi siempre presente allí donde hay pequeños rumiantes guardados*'. Existe una cierta asociación entre los biovars de *B. melitensis* (1, 2 y 3) y su localización geográfica: en el área mediterránea y Medio Oriente se aísla con mayor frecuencia el biovar 1 y 3 (Blasco, 2010a; Garin-Bastuji *et al.*, 1998)

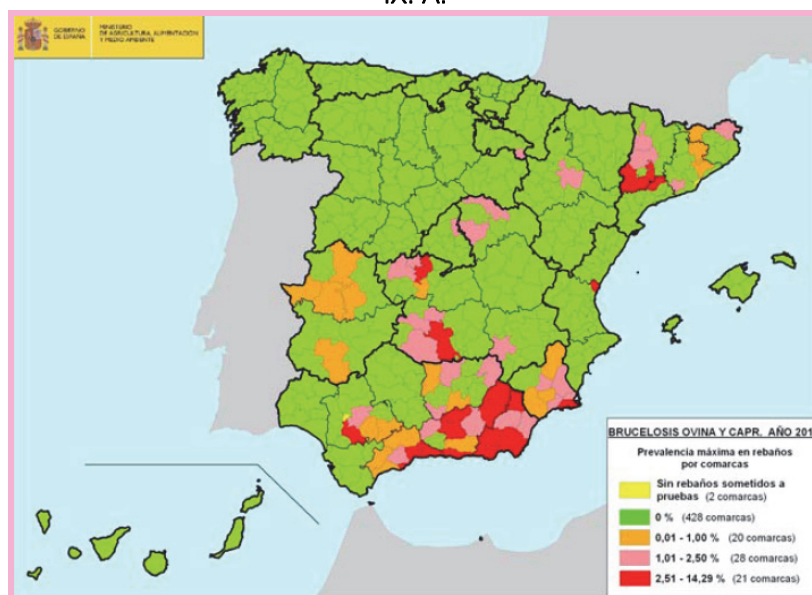
mientras que en América Latina predomina el biovar 1 (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

## Situación de España

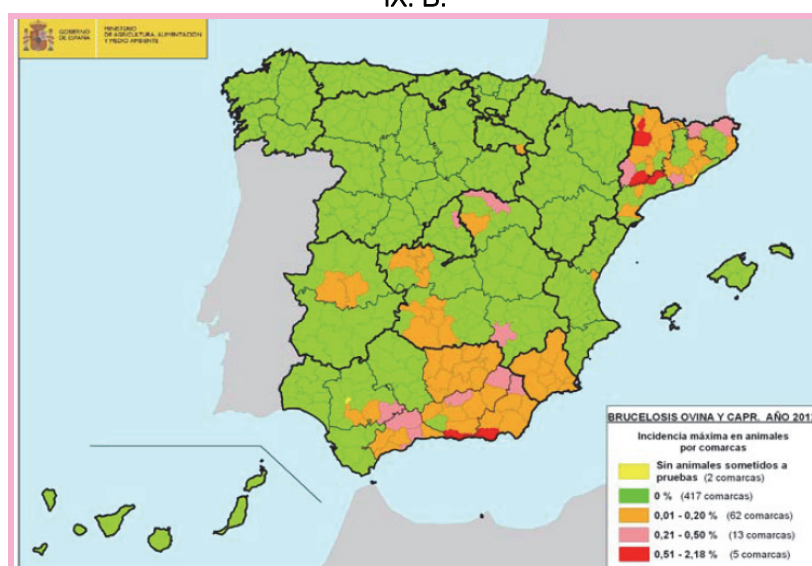
Considerando su ubicación geográfica (país mediterráneo) y el importante peso económico del sector ovino y caprino en España [existen aproximadamente 17 millones de ovejas y 3 millones de cabras en nuestro país ([www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es))], resulta lógico que España sea un país con una dilatada historia de brucelosis ovina y caprina. Crespo (Crespo, 1994) asocia una mayor incidencia de BOC con la zona centro y sur de España (donde existe un mayor número de cabezas de ganado ovino y caprino debido a las condiciones geográficas y climáticas). En nuestro país se ha descrito la presencia de los biovars 1, 2 y 3 de *B. melitensis* (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). Desde la entrada de España en la UE y la aplicación masiva y sistemática de programas de lucha contra la BOC en la totalidad del territorio español, se ha registrado un descenso de la prevalencia animal y, con ello, humana. Como puede observarse en la Figura IX, la brucelosis es un problema muy controlado en la mayoría de comarcas ganaderas. Las Islas Canarias, Islas Baleares, Asturias, Cantabria, País Vasco, Castilla y León, Galicia y Navarra son territorios oficialmente libres de enfermedad (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2013).



IX. A.



IX. B.



**Figura IX.** Mapa epidemiológico de la situación de la brucelosis ovina y caprina en las comarcas ganaderas de España (**Figura IX.A.** Prevalencia de rebaño en el año 2012; **Figura IX.B.** Incidencia en animales en el año 2012) (Ministerio de Agricultura 2013) (Fuente: Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

### III.C. Repercusiones sanitarias y económicas de la BOC

La importancia de esta enfermedad en el campo de la salud pública y la sanidad animal se refleja en la atención que ha suscitado en importantes

organizaciones internacionales. Dos claros ejemplo de ello son la Organización Mundial de la Salud (OMS) (que clasifica esta enfermedad como una de las siete zoonosis endémicas 'desatendidas' -*neglected*, enfermedades que no son prioritarias en los sistemas de salud pública tanto a nivel nacional como internacional: [www.who.int](http://www.who.int)) y GLEWS (Global Early Warning Systems -sistema mundial de detección temprana de emergencias de la OIE/FAO/WHO- que define la brucelosis causada por *B. melitensis* como una enfermedad zoonósica de prioridad: [www.glews.net](http://www.glews.net)).

Las consecuencias de la BOC en la **Sanidad Animal** son principalmente económicas. A pesar de que globalmente el sector de los pequeños rumiantes no posee el impacto económico que tienen otros sectores como el porcino o el avícola, sigue teniendo un importante peso en la economía mundial, especialmente en determinadas zonas de países en vías de desarrollo (Sherman, 2011) (donde el impacto de la BOC sobre la economía es mayor) (McDermott *et al.*, 2013). Dentro de los productos ovinos y caprinos que componen este mercado (carne, lana y fibras, piel), el comercio relativo a la leche no tratada térmicamente y los productos lácteos no pasteurizados de ovejas y cabras es el que presenta mayor riesgo para la transmisión de *B. melitensis* (Sherman, 2011). Las consecuencias de la presencia de BOC están directamente relacionadas con el impacto que tiene la patogenia de esta enfermedad (y sus signos clínicos) en la producción animal, además de las restricciones comerciales que conlleva en el comercio nacional e internacional (Díaz-Aparicio y Díaz, 2013; Seleem *et al.*, 2010), por ejemplo, a través de los controles sobre los movimientos del ganado ovino y caprino (Real Decreto 1941/2004, Directiva 2003/50/CE). Debido a su relevancia es una enfermedad de declaración obligatoria en la Unión Europea y en España (Directiva 82/894/CEE, Real Decreto 617/2007).

En los pequeños rumiantes la brucelosis causada por *B. melitensis* es una enfermedad asociada a una gran morbilidad (sobre todo en rebaños no inmunizados sin historial previo de enfermedad) y baja mortalidad en los animales infectados, cuyas principales consecuencias son fallos reproductivos: nacidos débiles y abortos que suelen observarse en el último tercio de gestación (Blasco, 2010a; Elzer *et al.*, 2002) (probablemente asociado a la multiplicación exponencial del patógeno en esta fase de la preñez como se ha observado en *B. abortus*) (Samartino *et al.*, 1994). A nivel de rebaño, los fallos reproductivos pueden tener lugar en forma de tormenta de

abortos (en ovino se han registrado abortos en el 10-16% del rebaño) (Radwan *et al.*, 1984), habituales en el caso de rebaños de cabras que se infectan por primera vez (Alton, 1990), aunque las gestaciones también pueden llegar a término (Crespo, 1994). Además, esta patología conlleva otras consecuencias como la reducción de los índices reproductivos y el descenso de más del 10% de la producción láctea (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001) (aunque raramente es asociada con mastitis) (Alton, 1990).

En el campo de la **Salud Pública**, la brucelosis se ha definido como la enfermedad zoonótica de origen bacteriano más frecuente en el mundo, describiéndose más de medio millón de nuevos casos cada año (Pappas *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2006b). Actualmente no hay vacunas autorizadas en la UE de eficacia probada para humanos (Doménech-Martínez *et al.*, 2009). En la antigua Unión Soviética y China se emplearon diferentes cepas vacunales (*B. abortus* S19, *B. melitensis* 104M) para la inmunización contra la brucelosis en humanos; sin embargo, el empleo de esta vacuna cayó en desuso debido a su limitada eficacia y la existencia de efectos adversos (Perkins *et al.*, 2010; Vershilova, 1961). Posteriormente se han propuesto diversos candidatos como posibles vacunas para personas (Hadjichristodoulou *et al.*, 1994; López-Merino *et al.*, 1976), aunque hasta la fecha ninguna ha sido reconocida como una solución en la lucha contra la brucelosis humana. En zonas endémicas, la incidencia anual puede variar desde  $< 0.01$  a  $>500$  casos por cada 100.000 habitantes (Pappas *et al.*, 2006b). Sin embargo, la brucelosis humana se considera una enfermedad probablemente sub-diagnosticada o sub-comunicada (Franco *et al.*, 2007; Godfroid *et al.*, 2005), calculándose que el número de casos reales podría ser 15-25 veces mayor de los que se notifican [WHO, 1997 citado por (Crespo *et al.*, 2012)].

Adicionalmente la brucelosis es una enfermedad de declaración no obligatoria en muchos países (Smits, 2013) lo que dificulta aún más el conocimiento sobre su situación en muchas regiones. Además la ausencia de signos patognomónicos contribuye al sub-diagnostico de esta patología (en regiones tropicales es frecuente diagnosticar a los pacientes con brucelosis como casos de malaria resistentes al tratamiento) (Gorvel, 2008). La brucelosis es una enfermedad asociada tradicionalmente a la pobreza y ampliamente distribuida en países en vías de

desarrollo donde supone un obstáculo para el progreso económico (Pappas y Papadimitriou, 2007; Smits, 2013). De manera similar a otras zoonosis, las condiciones socio-económicas que suelen acompañar a las poblaciones con recursos limitados hacen que se incremente el riesgo de contraer este tipo de enfermedades, disminuya la posibilidad de acceder a un diagnóstico y tratamiento adecuados y aumente la probabilidad de que tanto los animales como las personas que conviven con ellos enfermen, lo que puede suponer la incapacidad de algún miembro de la familia y, con ello, la disminución de ingresos y un descenso de la productividad (Maudlin y Weber-Mosdorf, 2006). Los planes enfocados a controlar y/o erradicar las enfermedades reproductivas (como la BOC) permiten el avance socio-económico de las zonas afectadas (Menzies, 2012) ayudando a disociar la relación entre brucelosis y perpetuación de la pobreza (Maudlin y Weber-Mosdorf, 2006).

En la Unión Europea, la brucelosis humana es una enfermedad de declaración obligatoria (en 2011, se declararon un total de 330 casos, la mayoría procedentes de España, Grecia y Portugal) (European Food Safety Authority y European Centre for Disease Prevention and Control, 2013). Actualmente, los casos de brucelosis en personas en países desarrollados suelen aparecer de forma ocasional y generalmente asociados a:

- i) Los desplazamientos (turismo, intervenciones militares, etc.) de personas procedentes de países libres de BOC a zonas endémicas que incrementan la posibilidad de adquisición de esta enfermedad (Memish y Balkhy, 2004) o personas que viven en países libres de brucelosis pero que proceden de países donde la brucelosis es común como lo observado por Al Dahouk *et al.* en Alemania (Al Dahouk *et al.*, 2005). Esta situación se agrava por el desconocimiento de esta patología por parte de los médicos de atención primaria de muchos de los países de origen (libres de enfermedad), lo que provoca un retraso en el diagnóstico (e incluso diagnósticos erróneos) (Alton, 1987).
- ii) La adquisición de *Brucella* en el laboratorio constituye una importante proporción de casos de enfermedad. De hecho, se considera una de las infecciones más comunes adquiridas de este modo (Young, 1995)

representando hasta el 2% del total de estas enfermedades (Robichaud *et al.*, 2004). La bibliografía recoge muchos casos descritos de brucelosis humana adquirida en el laboratorio (Demirdal y Demirturk, 2008; Gruner *et al.*, 1994; Noviello *et al.*, 2004; Sayin-Kutlu *et al.*, 2012; Traxler *et al.*, 2013). En nuestro país se llevó a cabo un estudio que determinó que un 11.9% de casos de brucelosis de un total de 628 trabajadores consultados se debían al contacto con *Brucella* en el laboratorio (Bouza *et al.*, 2005).

- iii) La importación ilegal de animales infectados y/o sus productos ha sido considerada también un factor de riesgo en este sentido. Por ejemplo, se han descrito casos de brucelosis en zonas del sur de los EE.UU. asociados al consumo de productos procedentes de México introducidos de manera fraudulenta en el país (Fosgate *et al.*, 2002).

La mayoría de los casos de brucelosis humana están causadas por tres especies del género *Brucella*: *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* (Díaz-Aparicio y Díaz, 2013). Aunque la prevalencia de estos patógenos puede variar en diferentes zonas geográficas, se considera que *B. melitensis* es el principal responsable de los casos de brucelosis humana en la mayor de parte del mundo (Corbel, 1997; Memish y Balkhy, 2004) y es la especie más virulenta para el hombre (Pappas *et al.*, 2005). Al contrario que *B. abortus* y *B. suis*, que se asocian normalmente a una exposición ocupacional, la infección por *B. melitensis* se produce en la población general (Acha, 2003), a menudo también asociada al consumo de leche y productos lácteos no pasteurizados (se calcula que aproximadamente el 85% de la leche de cabra se consume sin pasteurizar) (Nicoletti, 2010). En algunos países se ha observado que los brotes de brucelosis humana siguen una tendencia estacional, asociados a las épocas de parideras y lactación (Al Dahouk *et al.*, 2007; de Massis *et al.*, 2005). La forma en que se presenta la infección puede estar asociada al modo de transmisión: cuando la enfermedad aparece por el consumo de productos lácteos o leche sin previo tratamiento térmico la infección suele presentarse en forma de brotes, mientras que si se debe al contacto o manejo de animales infectados suele darse en forma de casos aislados (FAO, 2009).

La brucelosis causada por *B. melitensis* en los humanos se manifiesta como una enfermedad aguda (Mantur *et al.*, 2007) debilitante de sintomatología no

patognomónica o inespecífica (fiebre, dolor de cabeza, mialgia, anorexia, pérdida de peso, etc.) (Sauret y Vilissova, 2002). Puede progresar hasta una fase crónica (cuando se prolonga más de seis meses), convirtiéndose en una enfermedad recurrente que llegue a dar lugar a complicaciones como meningitis, abscesos hepáticos y, en casos más graves, endocarditis (que puede tener un desenlace fatal) (Franco *et al.*, 2007). Seleem *et al.* (Seleem *et al.*, 2010) rescataron una frase publicada en la revista Time en 1943 que resume las consecuencias que tiene la brucelosis humana si no es tratada: 'rara vez la enfermedad llega a matar a alguien pero a menudo logra que el paciente desee estar muerto'. El coste económico asociado al tratamiento de la brucelosis (una combinación de diferentes antibióticos durante un largo periodo de tiempo en casos moderados (que puede durar años si existen complicaciones) y las consecuencias de sufrir esta enfermedad debilitante (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000) contribuyen a la gran carga económica que la presencia de esta enfermedad conlleva (Adone y Pasquali, 2013; Franco *et al.*, 2007).

### III.D. *Brucella melitensis* como potencial arma biológica

El posible uso de *B. melitensis* como arma biológica se considera un factor más que incrementa la necesidad de controlar y erradicar este patógeno de la población animal y humana. El interés de su uso en el campo de la guerra biológica empezó en la Segunda Guerra Mundial (especialmente en Japón, EE.UU. y la antigua URSS) y tras la convención sobre armas biológicas acontecida en 1972 se abandonó la investigación sobre el uso de *Brucella* como agresivo bioterrorista (Neubauer, 2010). Las características de la enfermedad causada por *Brucella* (patología debilitante con tendencia a la cronicidad, largos periodos de incubación, bajo nivel de mortalidad) no la convertían en un arma biológica rápida y devastadora, pero sin embargo sí permitirían incapacitar a un gran número de soldados de las tropas enemigas (Neubauer, 2010). Esta idea no se centraba exclusivamente en la acción sobre los propios enfermos como consecuencia de la infección, sino también en todos los soldados que deberían hacerse cargo de los compañeros enfermos y, por tanto, quedarían alejados de la línea de combate (Pappas *et al.*, 2006a).

Diferentes autores (Godfroid *et al.*, 2011; Pappas *et al.*, 2006a) han expuesto una serie de características de la brucelosis y de su agente causal que justifican el interés de estos agentes microbianos en el campo del bioterrorismo: i) se trata de un patógeno altamente contagioso (dosis infectiva: 10-100 microorganismos) y transmisible por vía aérea, ii) su amplia distribución mundial hace que sea fácilmente adquirible prácticamente en cualquier lugar del mundo, iii) es una patología asociada mayoritariamente a países pobres donde suelen existir fuerzas armadas extranjeras desarrollando diferentes operaciones (en este contexto resultaría difícil diferenciar si un brote de enfermedad pudiera deberse a una infección natural o intencionada) y iv) el desconocimiento de las características de la brucelosis por parte de la mayoría de los médicos de países desarrollados podría demorar el diagnóstico o incluso causar falsas alarmas, incrementando las consecuencias del ataque.

A pesar de todo ello algunos autores (Rotz *et al.*, 2002) han concluido que la relevancia de *Brucella* como arma biológica puede considerarse fundamentalmente histórica, siendo clasificada como un agente de impacto médico y público más limitado que otros microorganismos como *Bacillus anthracis* o *Yersinia pestis*. Sin embargo, se debe considerar que este estudio se limitó al contexto de EE.UU y sus conclusiones no deben extrapolarse directamente a otros escenarios epidemiológicos (Neubauer, 2010). Kaufmann *et al.* (Kaufmann *et al.*, 1997) realizaron un estudio sobre el impacto económico y sanitario que supondría un ataque con *B. melitensis* (que supusiera la exposición a este patógeno de un total de 100.000 personas) con el fin de evaluar si era justificable o no llevar a cabo programas de prevención e intervención tras el ataque. Estos autores concluyeron que sin la aplicación de estos programas, el ataque mencionado supondría un total de 82.500 casos de enfermedad con necesidad de tratamiento, 413 muertes y un coste de 477,7 millones de dólares. En el campo de la sanidad animal, un ataque con *Brucella*, especialmente en países donde está erradicada, puede conllevar grandes pérdidas económicas (Godfroid *et al.*, 2011).

#### IV. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE BOC: MÁS DE 100 AÑOS DE LUCHA CONTRA UNA ZOONOSIS DIFÍCIL DE ERRADICAR



La brucelosis es una enfermedad cuyo control sólo puede ser abordado a través de la estrategia integral 'Un mundo, una salud' ya que sólo a través de la cooperación de los responsables de la sanidad animal y la salud pública es posible la lucha efectiva contra esta patología (Plumb *et al.*, 2013). Poco después de la descripción de la enfermedad, se puso de manifiesto la relación directa entre la brucelosis ovina y caprina y la enfermedad en humanos: la prohibición del consumo de leche cruda proveniente de cabras supuso un descenso drástico del número de casos de enfermedad entre los miembros de las tropas inglesas (Nicoletti, 2002). Por el contrario, los oriundos del lugar siguieron consumiendo la leche de estos animales por lo que la brucelosis se perpetuó como un grave problema de salud para este sector de la población (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). La principal fuente de infección de *B. melitensis* para los humanos son los animales (y/o productos derivados de los mismos) (Corbel, 1997) ya que la transmisión entre humanos a través de trasplantes, contacto sexual o durante la lactancia puede considerarse anecdótica, teniendo un impacto escaso en la epidemiología de esta enfermedad (Arroyo *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2007; Mantur *et al.*, 1996; Stantic-Pavlinic *et al.*, 1983). De hecho, se considera que las personas constituyen un 'fondo de saco' en la epidemiología de la brucelosis (Ficht y Adams, 2009). Como se ha comentado previamente la ausencia de una vacuna de eficacia probada en humanos (Doménech-Martínez *et al.*, 2009) hace que la principal medida de lucha contra esta enfermedad en humanos sea el control del patógeno en animales (Godfroid *et al.*, 2005; Roth *et al.*, 2003; Zinsstag *et al.*, 2005). La aparición de casos de brucelosis humana puede ser uno de los primeros indicadores de la presencia de la enfermedad en la cabaña ganadera (Alton, 1990). Del mismo modo, el descenso de la incidencia de enfermedad en personas puede servir como indicador del éxito de las campañas de control de *B. melitensis* en ovejas y cabras (Blasco, 2010a; FAO, 2009).

Se han dedicado grandes cantidades de tiempo, dinero y esfuerzo a la lucha contra la brucelosis causada por *B. melitensis* en los pequeños rumiantes. Sin embargo, a veces los resultados obtenidos no han conseguido el impacto esperado, e incluso han sido desalentadores en algunas ocasiones, al contrario de lo que ha ocurrido con la brucelosis bovina causada por *B. abortus*. Este hecho se puede deber a la confluencia de diferentes factores: por un lado, se presentan factores comunes a la brucelosis bovina y la BOC que son inherentes a la propia enfermedad



(como la existencia de estados de latencia asociada a la ausencia de respuesta serológica) y aquellos factores propios de las medidas de control y erradicación de la enfermedad causada por *Brucella* (por ejemplo no existe una prueba diagnóstica que permitan identificar la totalidad de los animales infectados) (Adone y Pasquali, 2013). Por otro lado, existen factores asociados al agente etiológico de BOC (como la relativa inespecificidad de *B. melitensis* para infectar diferentes especies animales (Alton, 1990) y la resistencia ambiental de esta especie bacteriana) (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001) y a ciertas prácticas de manejo propias de la producción de los pequeños rumiantes (trashumancia, aprovechamiento de pastos, etc.) (Smits, 2013). Además se ha de considerar que el control de BOC ha sido tradicionalmente menos exhaustivo que el control de la brucelosis bovina, dado que esta enfermedad ha estado asociada a la producción de pequeños rumiantes propia de zonas marginales y países en vías de desarrollo (Blasco y Molina-Flores, 2011).

La existencia de 'Estándares internacionales' para la fabricación y validación de vacunas y métodos diagnósticos, armonización de los sistemas de recogida de datos y comunicación de casos, etc. conlleva el establecimiento de sistemas de control más eficaces permitiendo el intercambio seguro tanto de animales vivos como de sus productos, la prevención de la entrada y diseminación de la brucelosis y la mejora de la salud pública y la sanidad animal en el contexto de un programa de control de brucelosis (Ragan *et al.*, 2013).

En este contexto **¿cómo se afronta la lucha contra este patógeno en oveja y cabras?** Son muchas las posibles respuestas a esta pregunta pero, en el caso de la BOC, la experiencia ha demostrado que tres medidas son especialmente efectivas en su prevención y control (Nicoletti, 2010):

1. Estrictas medidas higiénico-sanitarias y de manejo,
2. Diagnóstico serológico unido al sacrificio de los animales reactivos.
3. Vacunación

Ninguna de estas medidas profilácticas y/o de control aplicadas de manera individual es totalmente efectiva; sólo a través de la correcta combinación de al menos dos de ellas es posible conseguir avances en el control y/o erradicación de BOC.

#### IV.I. Medidas higiénico-sanitarias y de manejo

La entrada de *B. melitensis* al rebaño suele suceder por dos vías principalmente: la adquisición de animales infectados (que excretan la bacteria – normalmente durante la época de partos - infectando al resto de individuos del rebaño) o bien el contacto con material contaminado (pastos, instalaciones, etc.) (Alton, 1990; Blasco, 2010b; Duran-Ferrer y Paramio, 2005).

Las medidas higienico-sanitarias tienen como objetivo la reducción de la carga ambiental de la bacteria causante de enfermedad minimizando la posibilidad de contacto de *B. melitensis* con animales susceptibles. La desinfección de zonas contaminadas (por ejemplo, zonas de partos/abortos), la limpieza en profundidad previa a la desinfección o el tratamiento de estiércol y purines son algunas de las medidas adoptadas con esta finalidad (Alton, 1990; Benkirane, 2006).

Por su parte, las medidas de manejo están dirigidas a reducir la posibilidad de contacto de los animales con bacterias presentes en el ambiente, animales, y materiales contaminados como el aislamiento de animales sospechosos (hasta la confirmación de la infección), el uso de periodos de cuarentena (de animales de nueva adquisición), un estricto control de movimientos de animales o la separación física de hembras recién paridas (especialmente primíparas) del resto del rebaño (Adone y Pasquali, 2013; Alton, 1990). Existen determinadas prácticas de manejo (normalmente asociadas a zonas económicamente desfavorecidas donde la enfermedad se mantiene de forma endémica) que favorecen la transmisión de la BOC (y que por tanto deben ser controladas) como la trashumancia, el uso de pastos comunales (que ponen en peligro a otros animales que los comparten), la existencia de explotación de animales en forma de grandes rebaños (que dificultan el control de la infección por *Brucella* en el rebaño) y zonas de parideras masificadas y el

intercambio de animales sin los controles sanitarios necesarios (Reviriego *et al.*, 2000; Robinson, 2003; Samadi *et al.*, 2010).

## IV.II. Diagnóstico y sacrificio de animales reactivos

Esta estrategia de lucha contra la BOC suele aplicarse en zonas con niveles bajos de prevalencia de enfermedad y una buena situación económica y administrativa que soporte los gastos que esta medida conlleva (Blasco y Molina-Flores, 2011). De manera puntual esta estrategia también es útil para resolver problemas de brotes o rebaños con niveles muy altos de enfermedad (Smits, 2013). El sacrificio de los animales positivos a las pruebas diagnósticas empleadas en la lucha contra la BOC es un paso imprescindible ya que evita la circulación del patógeno y la infección de animales susceptibles. A pesar de que se han descrito casos de curación (incluso hay autores que hablan de un 10-15% de enfermos que se curan de forma espontánea) (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000) se sabe que muchos animales infectados pueden quedar como portadores silenciosos, recirculando el patógeno y, en situaciones en las que desciende la inmunidad colectiva, pudiendo dar lugar a tormentas de abortos.

### IV.II. A. Diagnóstico indirecto de la brucelosis ovina y caprina

El **diagnóstico indirecto** es aquel basado en la detección de la RI (humoral y/o celular) producida en el hospedador tras la infección por el patógeno. La primera prueba serológica para la detección de esta patología fue desarrollada por Wright y Smith en 1987; se trataba de una seroaglutinación lenta usada para el diagnóstico de la brucelosis humana (Wright y Smith, 1897). La investigación sobre los métodos de detección de *B. melitensis* ha ido siguiendo la estela marcada por los avances diagnósticos conseguidos en la lucha contra *B. abortus* en el ganado bovino. Es por ello que la mayoría de las técnicas serológicas que se emplean de manera rutinaria en el diagnóstico serológico [la prueba del Rosa de Bengala (RB) y la prueba de Fijación del Complemento (FC)] de la BOC fueron originariamente desarrolladas para la detección de anticuerpos frente a *B. abortus* en ganado bovino (Crespo, 1994;

Garin-Bastuji *et al.*, 1998; Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001). Esto es debido a que se fundamentan en el mismo mecanismo de acción, es decir, se basan en una reacción antígeno-anticuerpo siendo los principales anticuerpos involucrados aquéllos producidos contra el LPS propio de cepas lisas del género *Brucella* (como *B. abortus* y *B. melitensis*). Diferentes autores han observado una reducción de la sensibilidad y especificidad de las principales técnicas serológicas usadas en las campañas de lucha contra la BOC [RB y FC], en comparación con lo observado en ganado bovino, cuando se aplican en los pequeños rumiantes (Falade, 1978; Nicoletti, 2010), especialmente en el ganado caprino (Kolar, 1984). Se ha cuestionado la idoneidad de usar antígenos obtenidos a partir de cepas A-dominantes (como *B. abortus*) en la detección de anticuerpos frente a cepas M-dominantes (como *B. melitensis* biovar 1) (Alton, 1971; Alton *et al.*, 1988; Corbel, 1985a; Jacques *et al.*, 1998; Nicoletti, 1969). Sin embargo diferentes investigadores (Blasco *et al.*, 1994a; Jacques *et al.*, 1998; Tittarelli *et al.*, 2005b) han demostrado que el antígeno fabricado a partir de *B. abortus* confiere una buena sensibilidad a la prueba de RB y otras pruebas serológicas para detectar ovejas con BOC. Este hecho podría estar posiblemente relacionado con la existencia de un epítipo común (el epítipo C) en el LPS de las cepas A y M (Alonso-Urmeneta *et al.*, 1998; Díaz-Aparicio *et al.*, 1993; Weynants *et al.* 1997) y la presencia de estructuras químicas comunes en cepas A y M (pequeña proporción de enlaces  $\alpha$ -1,3 en homopolímeros de 4,6-dideoxi-4-formamido-D-manopiranososa en cepas A y la presencia en cepas M de determinantes comunes de tri- o tetrasacáridos propios de las cepas A) (Blasco *et al.*, 1994a; Bundle *et al.*, 1989).

Una elevada sensibilidad y especificidad son dos características fundamentales de las pruebas usadas en los programas de control/erradicación para poder garantizar su éxito (Nielsen *et al.*, 2004a). Un resultado negativo en una prueba serológica empleada en el diagnóstico de BOC nunca excluye por completo la posibilidad de que exista una infección por *B. melitensis* en el individuo analizado (Godfroid *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2011). Del mismo modo se ha de considerar que un resultado positivo en estas pruebas serológicas no es una indicación definitiva de infección activa por este patógeno (Godfroid *et al.*, 2010), existiendo un importante problema de interferencia diagnóstica cuando los animales muestreados presentan anticuerpos frente a algunas bacterias Gram negativas con LPS similar al de *Brucella*,

como *Yersinia enterocolitica* (Garin-Bastuji *et al.*, 1998; Nielsen, 2002) (aunque su relevancia en la aparición de falsos positivos en ganado ovino ha sido objeto de debate considerando su baja prevalencia) (Ferreira *et al.*, 2003). Este problema se ve acrecentado en las técnicas basadas en la detección de IgM (Corbel, 1985b) siendo las pruebas basadas en la detección de IgG<sub>1</sub> las más útiles en este sentido (Nielsen, 2002). Un problema adicional en términos de falta de especificidad de las pruebas serológicas se deriva de la interferencia diagnóstica que causan los anticuerpos producidos tras la vacunación (OIE, 2009b). Además, se pueden observar resultados contradictorios (por ejemplo animales positivos a una prueba y negativos a otra) cuando se usa más de una técnica serológica para diagnosticar la BOC. Esto se puede deber a diversos factores tales como las características de cada prueba aplicada (Rahman *et al.*, 2013) o ciertas situaciones epidemiológicas [como la fase de infección en la que se encuentre un animal, al inicio (fase prealérgica) o al final de la misma] (Blasco, 2004; Duran-Ferrer y Paramio, 2005).

Las limitaciones del diagnóstico serológico en el caso de la BOC hacen que sea necesaria una confirmación bacteriológica/epidemiológica de la infección (al menos a nivel de rebaño) que complemente la interpretación de estas pruebas indirectas (Blasco, 2004). Varios autores coinciden en que no existe ninguna prueba serológica capaz de detectar todos los animales infectados con *Brucella* (Abuharfeil *et al.*, 1998; Blasco, 2004; Crespo, 1994; Farina, 1985; Kolar, 1995; Mahajan y Kulshreshtha, 1991). Nicoletti *et al.*, (Nicoletti, 1969) afirmaron que teniendo en cuenta las limitaciones de las pruebas serológicas a nivel individual, aproximadamente el 70% de los animales infectados podían ser detectados, por lo que resulta altamente aconsejable la interpretación de estas técnicas a nivel de rebaño para el control/erradicación de la BOC (Crespo, 1994; Farina, 1985) considerando que la existencia de un solo animal infectado implica la posible exposición de todo el rebaño (Kolar, 1984; Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). El coste de la prueba, la facilidad de su realización y el tiempo en la obtención de los resultados son otras de las características que deben considerarse a la hora de elegir las técnicas usadas en los programas de erradicación de la BOC (Nielsen *et al.*, 2004a).

### *Técnicas diagnósticas basadas en la respuesta inmune serológica frente a B. melitensis*

Las tablas II-IX recogen los principales trabajos que se han llevado a cabo desde el año 2000 hasta la actualidad sobre evaluación de los test de RB (Tablas II y III), FC (Tablas IV y V), ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*; Tablas VI y VII) y FPA (*Fluorescence Polarization Assay*; Tablas VIII y IX), respectivamente, en términos de sensibilidad y especificidad.

#### *A. Test del Rosa de Bengala (RB)*

Se trata de una técnica de aglutinación en porta que utiliza como antígeno células de *B. abortus* S99 o S1119-3 teñidas con Rosa de Bengala al 1% (OIE, 2009b) y que detecta principalmente IgM y IgG<sub>1</sub> (Crespo, 1994) (mayoritariamente frente al LPS de cepas lisas de *Brucella*) (Morgan *et al.*, 1969). El antígeno está tamponado con un pH ácido ( $3.65 \pm 0.5$ ) con el fin de limitar la aglutinación debida a IgM y favorecer aquella asociada a IgG<sub>1</sub> incrementado así la especificidad de la técnica (Nielsen, 2002). El fundamento de esta técnica consiste en mezclar el antígeno con el suero problema y observar la aglutinación sobre un fondo de luz blanca en un tiempo de 4 minutos, durante el cual deben realizarse movimientos circulares constantes (un tiempo mayor puede conllevar la formación de coágulos de fibrina) (Poester *et al.*, 2010).

Algunos autores han estudiado diferentes aproximaciones para optimizar los resultados obtenidos con la prueba del RB en el diagnóstico de la BOC: Trap y Gaumont (1976) (citado por Alton, 1990) observaron un incremento de su sensibilidad al reducir la concentración celular del antígeno aunque Blasco *et al.* (Blasco *et al.*, 1994a) obtuvieron resultados contradictorios a este respecto. Diferentes autores han comprobado que el incremento de la cantidad de suero usado (75µl en vez de 25µl) provoca un aumento tanto en la sensibilidad de la técnica como en su correlación con los resultados de la prueba de fijación de complemento en el ganado ovino y caprino (Blasco *et al.*, 1994a; Díaz-Aparicio *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 2003). La temperatura es uno de los parámetros que deben controlarse para la conservación del antígeno y para la misma realización del test ya que los resultados pueden verse afectados (Alton, 1990). La principal característica de esta técnica es su alta sensibilidad, lo que

la hace muy adecuada para determinar la presencia/ausencia de infección a nivel de rebaño (OIE, 2009b). Sus bajos requerimientos técnicos, de infraestructura y de personal, la rapidez en la obtención de resultados y el bajo coste son algunas de las características que han hecho que esta herramienta diagnóstica sea ampliamente utilizada desde su descripción.

Los principales inconvenientes que presenta están relacionados con sus limitaciones en términos de sensibilidad y especificidad en determinadas condiciones: i) presencia de falsos reactores (por ejemplo, interferencia con anticuerpos debidos a la vacunación con Rev. 1 -aunque este problema se reduce considerablemente cuando la vacunación se realiza por vía conjuntival-)(Díaz-Aparicio *et al.*, 1994; Jiménez de Bagues *et al.*, 1992), ii) presencia de falsos negativos (por ejemplo, efecto prozona (Nielsen, 2002): ausencia de reacción antígeno-anticuerpo debido, en este caso, a un exceso de anticuerpos) y iii) variación de los valores de sensibilidad de la prueba a nivel individual en función de la prevalencia de enfermedad (sobre todo en ovejas) (Blasco *et al.*, 1994a). La subjetividad de los resultados obtenidos y la limitación de la naturaleza de la muestra empleada para la técnica (sólo se puede usar suero) son otros de sus inconvenientes (Nielsen, 2002).

Considerando las características de esta técnica, en muchos países (incluyendo España) se usa como prueba de cribado (*screening*) a nivel de rebaño (Alton, 1990; Blasco *et al.*, 1994a) cuyas reacciones positivas deben ser confirmadas con alguna técnica adicional en ausencia de evidencias de infección. Sin embargo, en aquellas circunstancias en las que la infección ha sido confirmada a nivel de rebaño esta técnica se puede utilizar en paralelo junto con la técnica de Fijación de Complemento con el fin de incrementar la probabilidad de detección de a nivel individual (Garin-Bastuji *et al.*, 2006), pudiéndose observar en ocasiones animales reactores a FC y negativos a RB, especialmente cuando la prevalencia de la enfermedad es reducida (Blasco *et al.*, 1994a).

**Tabla II.** Principales estudios sobre la sensibilidad de la Prueba del Rosa de Bengala desarrollados desde el año 2000 hasta la actualidad.

| Estudio                                | Tipo RB <sup>a</sup> | N    | Criterio de referencia <sup>b</sup>   | Sensibilidad | 95% IC Sup. | 95% IC Inf. | Especies incluidas <sup>c</sup> | Observaciones      |
|--|----------------------|------|---------------------------------------|--------------|-------------|-------------|---------------------------------|--------------------|
| Ferreira <i>et al.</i> 2003            | A                    | 219  | C                                     | 98.6         |             |             | OV                              |                    |
|  | B                    |      |                                       | 95           |             |             |                                 |                    |
| Nielsen <i>et al.</i> 2004a            | C                    | 72   | C                                     | 76.4         |             |             | OV                              |                    |
| Minas <i>et al.</i> , 2005             | A                    | 166  | C                                     | 97.59        | 95.26       | 99.92       | OV                              |                    |
|  | B                    |      |                                       | 90.36        | 85.87       | 94.85       |                                 |                    |
| Minas <i>et al.</i> , 2007             | A                    | 2099 | ≥2 pruebas (RB, mRB, FC, IE, CE, FPA) | 86.6         | 85.2        | 88.1        | OV-CA                           |                    |
|  | B                    | 2119 |                                       | 75.8         | 74          | 77.7        |                                 |                    |
| Ramirez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008a | B                    | 264  | C o P o IE y CE                       | 81.1         |             |             | CA                              |                    |
|  | D                    | 381  |                                       | 99.7         |             |             |                                 |                    |
| Muktaderul Ahmed <i>et al.</i> , 2011  | A                    | 108  | CE                                    | 100          |             |             | CA                              |                    |
| Al-Mariri <i>et al.</i> , 2011         | B                    | 1228 | FC                                    | 91           |             |             | OV                              |                    |
| Rahman <i>et al.</i> 2013              | B                    | 1044 |                                       | 82.8         | 68.1        | 92.9        | OV                              | Análisis Bayesiano |
|  |                      | 636  |                                       | 80.2         | 67.7        | 92.7        | CA                              |                    |
| García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2014  | B                    | 53   | C+FC                                  | 94.3         | 88.1        | 100         | OV                              |                    |

<sup>a</sup> A: Blasco *et al.*, 1994 (75µL sueros + 25µL antígeno); B: OIE Manual of Standards (2009)/Alton *et al.*, 1988; C: combinación RBT/BPAT (Buffered Antigen Plate Agglutination Test D:El volumen de células del antígeno es del 3%

<sup>b</sup> FC=Fijación del Complemento, C= cultivo, P= PCR, IE= ELISA indirecto, CE= ELISA de competición, RB= Rosa de Bengala, RBm= Rosa de Bengala modificado

<sup>c</sup> OV=ovejas/CA=cabras/OV-CA=ovejas y cabras

**Tabla III.** Principales estudios sobre la especificidad de la Prueba del Rosa de Bengala desarrollados desde el año 2000 hasta la actualidad

| Estudio                              | Tipo RB <sup>a</sup> | N    | Criterio de referencia <sup>b</sup>         | Especificidad | 95% IC Sup. | 95% IC Inf. | Especies incluidas <sup>c</sup> | Observaciones      |
|--------------------------------------|----------------------|------|---|---------------|-------------|-------------|---------------------------------|--------------------|
| Ferreira <i>et al.</i> 2003          | A                    | 212  | C   | 100           |             |             | OV                              |                    |
|                                      | B                    |      |   | 100           |             |             |                                 |                    |
| Nielsen <i>et al.</i> 2004a          | C                    | 994  | H   | 99.7          |             |             | OV                              |                    |
| Minas <i>et al.</i> 2005             | A                    | 851  | H   | 98.12         | 97.21       | 99.03       | OV                              |                    |
|                                      | B                    |      |   | 99.64         | 99.25       | 100         |                                 |                    |
| Minas <i>et al.</i> , 2007           | A                    | 2154 | H   | 97.6          | 97          | 99.9        | OV-CA                           |                    |
|                                      | B                    |      |   | 99.7          | 99.5        | 99.9        |                                 |                    |
| Ramirez-Pfeiffer <i>et al.</i> 2008a | B                    | 95   | H + NV(n=96) ó H+IE/CE (n=125) <sup>d</sup> | 68.4          |             |             | CA                              |                    |
|                                      | D                    | 153  |   | 32.7          |             |             |                                 |                    |
| Muktaderul Ahmed <i>et al.</i> 2011  | A                    | 108  | CE  | 93.94         |             |             | CA                              |                    |
| Rahman <i>et al.</i> 2013            | B                    | 1044 |   | 98.3          | 97.4        | 99          | OV                              | Análisis bayesiano |
|                                      |                      | 636  |   | 99.6          | 98.9        | 99.9        | CA                              |                    |
| García-Bocanegra <i>et al.</i> 2014  |                      | 65   | C+FC  | 100           | 100         | 100         | OV                              |                    |

<sup>a</sup> A: Blasco *et al.*, 1994 (75µL sueros + 25µL antígeno); B: OIE Manual of Standards (2009)/Alton *et al.*, 1988; C: combinación RBT/BPAT (Buffered Antigen Plate Agglutination Test D:El volumen de células del antígeno es del 3%

<sup>b</sup> H= historial, granjas libres de *Brucella*, FC=Fijación del Complemento, C= cultivo, P= PCR, IE= ELISA indirecto, CE= ELISA de competición, RB= Rosa de Bengala, RBm= Rosa de Bengala modificado, NV= no vacunado

<sup>c</sup> OV=ovejas/CA=cabras/OV-CA=ovejas y cabras

<sup>d</sup> Procedentes de una zona donde no se vacuna, sin historial de abortos, negativos a dos pruebas consecutivas de RBT y a IELISA y CELISA



*B. Técnica de Fijación del Complemento (FC)*

Esta prueba se basa en la capacidad del complemento (obtenido a partir de suero de cobayas) para lisar eritrocitos (tradicionalmente se emplean eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina). Cuando existen anticuerpos en un determinado suero problema, éstos se unen específicamente a antígenos de *Brucella* (células íntegras) aportados externamente formándose complejos antígeno-anticuerpo a los que se une el complemento (Alton *et al.*, 1988). En este caso la cantidad de complemento presente en la reacción disminuye, impidiendo su unión a la hemolisina y previniendo la lisis de los eritrocitos añadidos posteriormente. El complemento del suero problema se inactiva mediante calor (56°C, 30-60min) (Nielsen, 2002). Los anticuerpos que participan en esta reacción son IgM e IgG<sub>1</sub> fundamentalmente (Crespo, 1994). Existen dos variantes de la técnica: aquella en la que la primera incubación se realiza a 37°C durante 1h (Hill, 1963) y otra en la que se realiza en frío (4°C, 18h) (Mackinnon, 1963).

En condiciones de campo, la FC puede mostrar una menor sensibilidad que la prueba del RB y, al igual que ésta, presenta una mayor fiabilidad a nivel de rebaño que a nivel individual (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). La sensibilidad de esta prueba está también directamente relacionada con la fase de infección en la que se encuentran los animales analizados (Blasco *et al.*, 1994b): en animales crónicamente infectados se han determinado valores de sensibilidad del 88.6% para la FC poniendo en duda la validez de esta técnica diagnóstica a nivel individual (Blasco *et al.* 1994a; Nicoletti, 1969). Sin embargo en animales clínicamente infectados en una fase aguda (que han sufrido aborto debido a *B. melitensis* y en los que se observa excreción de la bacteria), la sensibilidad puede alcanzar el 100% (Jiménez de Bagues *et al.* 1992).

Los inconvenientes que presenta esta técnica se basan en la subjetividad de su interpretación (especialmente para títulos bajos), la complejidad de su realización y la variabilidad de los reactivos, procedimientos, etc. (Garin-Bastuji *et al.*, 2006). Además se ha de considerar la potencial actividad anticomplementaria que puede existir en el suero estudiado, especialmente si procede de oveja (Alton, 1990), lo que

puede conducir a la aparición de falsas reacciones positivas, si bien se ha intentado minimizar este inconveniente con ajustes en el procedimiento de la técnica.

**Tabla IV.** Principales estudios sobre la sensibilidad de la Prueba de la Fijación del Complemento desarrollados desde el año 2000 hasta la actualidad.

| Estudio                              | Tipo <sup>a</sup> | N    | Criterio de referencia <sup>b</sup> | Sensibilidad | 95% IC Sup. | 95% IC Inf. | Especies incluidas <sup>c</sup> |
|--------------------------------------|-------------------|------|-------------------------------------|--------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Ferreira <i>et al.</i> 2003          | C                 | 219  | C                                   | 92.7         |             |             | OV                              |
| Nielsen <i>et al.</i> 2004a          | A                 | 72   | C                                   | 81.9         |             |             | OV                              |
| Minas <i>et al.</i> 2005             | C                 | 166  | C                                   | 98.79        | 97.14       | 100         | OV                              |
| Ramirez-Pfeiffer <i>et al.</i> 2007  | B                 | 301  | IE/CE                               | 83.7         |             |             | CA                              |
|                                      | D                 | 370  |                                     | 98.4         |             |             |                                 |
| Minas <i>et al.</i> 2007             | C                 | 2109 | ≥2 pruebas (RB, mRB, FC, IE)        | 80.6         | 78.9        | 82.3        | OV-CA                           |
| Ramirez-Pfeiffer <i>et al.</i> 2008a | B                 | 381  | C o P o IE y CE                     | 87.1         |             |             | CA                              |
|                                      | A                 |      |                                     | 98.4         |             |             |                                 |

<sup>a</sup> A=FC incubado a 4°C toda la noche (Samagh, B. y Boulanger, P. (1978) Adaptation of the Technicon Autoanalyzer II for an automated complement fixation test for detection of antibody to *Brucella abortus* in bovine serums. Proc. 21st Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost., pp. 347); B=FC con 4.5%; contenido celular, pos>4, según 08-20-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales; C: OIE; D: Alton *et al.*, 1988, pos>5

<sup>b</sup> FC=Fijación del Complemento, C= cultivo, P= PCR, IE= ELISA indirecto, CE= ELISA de competición, RB= Rosa de Bengala, RBm= Rosa de Bengala modificado

<sup>c</sup> OV=ovejas/CA=cabras/OV-CA=ovejas y cabras

**Tabla V.** Principales estudios sobre la especificidad de la Prueba de la Fijación del Complemento desarrollados desde el año 2000 hasta la actualidad.

| Estudio                              | Tipo <sup>a</sup> | N        | Criterio de referencia <sup>b</sup>   | Especificidad | 95% IC Sup. | 95% IC Inf. | Especies incluidas <sup>c</sup> |
|--------------------------------------|-------------------|----------|---------------------------------------|---------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Ferreira <i>et al.</i> 2003          | C                 | 212      | C                                     | 100           |             |             | OV                              |
| Nielsen <i>et al.</i> 2004a          | A                 | 994      | H                                     | 99.4          |             |             | OV                              |
| Minas <i>et al.</i> 2005             | C                 | 851      | H                                     | 100           | 100         | 100         | OV                              |
| Ramirez-Pfeiffer <i>et al.</i> 2007  | B                 | 84       | IE/CE                                 | 65.5          |             |             | CA                              |
|                                      | D                 | 138      |                                       | 84.8          |             |             |                                 |
| Minas <i>et al.</i> 2007             | C                 | 215<br>4 | H                                     | 99.1          | 99.8        | 100         | OV-CA                           |
| Ramirez-Pfeiffer <i>et al.</i> 2008a | B                 | 221      | H + NV(n=96) ó<br>NH+IE/CE<br>(n=125) | 65.5          |             |             | CA                              |
|                                      | A                 |          |                                       | 84.9          |             |             |                                 |

<sup>a</sup> A=FC incubado a 4°C toda la noche (Samagh, B. y Boulanger, P. (1978) Adaptation of the Technicon Autoanalyzer II for an automated complement fixation test for detection of antibody to *Brucella abortus* in bovine serums. Proc. 21st Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost., pp. 347); B=FC con 4.5%; contenido celular, pos>4, según 08-20-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales; C: OIE; D: Alton *et al.*, 1988, pos>5

<sup>b</sup> H: historal, procedente de una zona/rebaño libre de brucelosis, FC=Fijación del Complemento, C= cultivo, P= PCR, IE= ELISA indirecto, CE= ELISA de competición, RB= Rosa de Bengala, RBm= Rosa de Bengala modificado, NV=no vacunados

<sup>c</sup> OV=ovejas/CA=cabras/OV-CA=ovejas y cabras

Aunque se ha especulado sobre su potencial valor para diferenciar animales vacunados e infectados debido a la incapacidad de la prueba para detectar animales vacunados con Rev. 1 a los 2-4 meses tras la vacunación (Kolar, 1984), en la práctica se ha comprobado que la FC presenta una especificidad relativamente baja cuando se aplica en animales vacunados con Rev. 1 en los meses posteriores a la inmunización (Jiménez de Bagues *et al.*, 1992; Marín *et al.*, 1999), especialmente si la vacunación se realiza por la vía subcutánea (Díaz-Aparicio *et al.*, 1994), y en caso de animales sensibilizados con ciertas bacterias (como *Y. enterocolítica* O:9) (Garin-Bastuji *et al.*, 2006). La FC se ha usado ampliamente como técnica confirmatoria en los programas de erradicación y control de BOC (Garin-Bastuji *et al.*, 2006).

#### *C. Seroaglutinación lenta en tubo (SAT)*

Se basa en la detección de aglutininas [principalmente IgMs típicas de las fases tempranas de la enfermedad (Fensterbank, 1987; Kolar, 1984), aunque también IgG1 e IgG2 (Alton, 1990)] dirigidas contra *Brucella* spp. Las células suelen estar teñidas para mejorar la visualización de los resultados: cuando existen anticuerpos en el suero problema se forman inmunocomplejos que sedimentan formando un punto o botón en el fondo del tubo. A pesar de presentar una serie de inconvenientes (menor sensibilidad y especificidad que las técnicas del RB y FC, requerir altas cantidades de antígeno y la imposibilidad de automatización del método) (Fensterbank, 1987; Kolar, 1984; Mahajany Kulshreshtha, 1991; Waghela *et al.*, 1980), algunos autores han demostrado su utilidad en el control de la BOC (Radwan *et al.*, 1984). El empleo de agentes quelantes, como el EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), elimina un alto porcentaje de reacciones de aglutinación inespecíficas que pueden presentarse en esta técnica (Crespo, 1994). Se ha estudiado una modalidad de esta técnica en formato microplaca en el contexto del diagnóstico de los pequeños rumiantes con el fin de mejorar la sensibilidad de la técnica y permitir su aplicación a gran escala (Baum *et al.*, 1995; Bettelheim *et al.*, 1983).

#### *D. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)*

Se trata de una técnica de inmunoensayo basada en la detección de anticuerpos a partir de antígenos inmovilizados que tapizan una placa en la que tiene

lugar una reacción antígeno-anticuerpo. Esta reacción se pone de manifiesto mediante el empleo de anticuerpos unidos a un enzima que, en presencia del sustrato adecuado, dará una reacción colorimétrica. Su primera aplicación en el diagnóstico de la brucelosis se produjo en medicina humana en el año 1976 (Carlsson *et al.*, 1976). A lo largo de los sucesivos años se han desarrollado diferentes estudios sobre su aplicación en el diagnóstico de *B. melitensis* en los pequeños rumiantes (Abuharfeil, 1998; Alonso-Urmeneta *et al.*, 1988; Blasco *et al.*, 1994b; Cloeckeaert *et al.*, 2001a; Debbbarh *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 1995b; Delpino *et al.*, 2003; Díaz-Aparicio *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 2003; Jiménez de Bagues *et al.*, 1992; Marín *et al.*, 1999; Portanti *et al.*, 2006). De manera general se considera que los ELISAs que usan LPS como antígeno principal son los más útiles (OIE, 2009b; Garin-Bastuji *et al.*, 2006). No obstante, si bien ofrecen una buena sensibilidad (similar o superior a la del RB y la FC) (Garin-Bastuji *et al.*, 2006), los ELISAs basados en LPS suelen presentar problemas de interferencia diagnóstica cuando se analizan animales vacunados con Rev. 1 en los que persisten los anticuerpos vacunales o aquéllos expuestos a alguna de las bacterias Gram negativas con LPS similar al de las cepas lisas de *Brucella* (Nielsen, 2002). Se ha estudiado el empleo de otros antígenos como proteínas de membrana externa o citoplasmática en el desarrollo de nuevas técnicas ELISA pero, en general, se considera que la respuesta serológica desarrollada frente a estos antígenos es heterogénea y retardada si se compara con la observada frente al LPS (Debbbarh *et al.*, 1996; Delpino *et al.*, 2003; Zygmunt *et al.*, 1994b). Al contrario que la proteína CP24, cuya utilidad ha sido puesta en duda (Delpino *et al.*, 2003), la proteína CP26 (o CP28) se ha estudiado para el desarrollo de técnicas ELISA (indirecto y competición) capaces de diferenciar animales infectados y vacunados basándose en la diferente afinidad y/o especificidad por CP28 de los anticuerpos anti-Rev. 1 y aquéllos derivados de la infección por *B. melitensis* (Salih-Alj *et al.*, 1996) y/o en la menor persistencia de Rev. 1 en el hospedador (Debbbarh *et al.*, 1996). Diversos estudios en ganado ovino han obtenido valores de sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA basada en CP28 de 80-100% y 93%, respectivamente (Cloeckeaert *et al.*, 2001; Salih-Alj *et al.*, 1996). A pesar de estos prometedores resultados, se ha de resaltar que la respuesta serológica frente al O-PS observada es más intensa, menos heterogénea y más temprana que aquélla observada frente a CP28 (Debbbarh *et al.*, 1996; Salih-Alj *et al.*, 1996) pudiendo repercutir en el rendimiento de las pruebas diagnósticas en el contexto de un

programa de erradicación y control. El Hapteno Nativo también se ha estudiado como antígeno para la detección de anticuerpos frente a *B. melitensis* mediante ELISA en pequeños rumiantes (Tabla VI y VII).

Diferentes autores han demostrado la utilidad de los ELISAs indirectos en zonas donde no se aplique la vacunación con Rev. 1 para el control de BOC o en áreas con incidencia de enfermedad baja (Díaz-Aparicio *et al.*, 1994; Jacques *et al.*, 1998; Jiménez de Bagues *et al.*, 1992). El uso de ELISAs cuyo conjugado tiene mayor afinidad por las IgGs puede conllevar un retraso en la detección de la respuesta serológica frente a *B. melitensis* en comparación con lo observado usando RB y CF (basados también en la detección de IgM) (Jacques *et al.*, 1998). Se ha observado que el uso de Proteína G como conjugado incrementa la especificidad de la prueba reduciendo la reactividad residual que pueden presentar algunos animales (Díaz-Aparicio *et al.*, 1994; Stournara *et al.*, 2007). Los ELISAs de competición por su parte presentan una mayor especificidad en la detección de anticuerpos frente a *B. melitensis* en animales infectados por cepas de campo comparada con la observada en ELISAs indirectos (Marín *et al.*, 1999) debido a la aparente menor afinidad de los anticuerpos vacunales (que son desplazados por los anticuerpos monoclonales C/Y empleados en el ensayo) por el antígeno en relación con las inmunoglobulinas producidas por el hospedador tras la infección por cepas de campo (MacMillan *et al.*, 1990; Marín *et al.*, 1999; Nielsen, 2002) lo que, en teoría, podría mejorar la diferenciación de animales vacunados e infectados (Biancifiori *et al.*, 2000).

La automatización (y, gracias a ella, su aplicación a gran escala), reproducibilidad y objetividad en los resultados obtenidos son algunas de las ventajas que presentan los ELISAs, de los que existen multitud de kits comerciales. Además de técnicas de ELISA para el análisis de muestras de suero se han desarrollado ELISAs basados en la detección de anticuerpos en leche de ovejas (Chand *et al.*, 2004; Chand *et al.*, 2005; Tittarelli *et al.*, 2006; Biancifiori *et al.*, 1996) y cabras (Bosnakovski *et al.*, 2010; Funk *et al.*, 2005). Hay autores que han planteado el ELISA en leche como una buena alternativa al Test del anillo en leche (MRT; ver más adelante) (Chand *et al.*, 2004) aunque su validez en el análisis de leche de tanque o 'pooles' de muestras ha sido objeto de debate (Biancifiori *et al.*, 1996; Funk *et al.*, 2005; Tittarelli *et al.*, 2006;).

Tabla VI. Principales estudios sobre la sensibilidad de técnicas ELISA desarrolladas desde el año 2000 hasta la actualidad

| Estudio                        | Tipo <sup>a</sup> | Diana <sup>b</sup> | N    | Criterio de referencia <sup>c</sup> | Sensibilidad | 95% IC inferior | 95% IC superior | Especies Incluidas <sup>d</sup> | Observaciones  |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|------|-------------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|--|
| Blancifiori <i>et al.</i> 2000 | C                 | LPS                | 176  | FC                                  | 99.4         | 96.9            | 99.9            | OV-CA                           |  |
| Cloeckaert <i>et al.</i> 2001a | I                 | CP28               | 50   | C y RBT y CFT                       | 100          |                 |                 |                                 | Cultivo negativo<br>Serología y cultivo<br>negativo  |
|                                |                   |                    | 50   | RBT y CFT y DTH                     | 88           |                 |                 | OV                              |  |
| Ferreira <i>et al.</i> 2003    | I                 | LPS                | 19   | DTH                                 | 84           |                 |                 |                                 | OV   |
|                                |                   |                    | 219  | C                                   | 96.8         |                 |                 |                                 |  |
| Nielsen <i>et al.</i> 2004a    | C                 | LPS                | 72   | C                                   | 91.7         |                 |                 | OV                              |  |
|                                |                   |                    | 75   |                                     | 75           |                 |                 |                                 |  |
| Burriel <i>et al.</i> , 2004   | C                 | LPS                | 155  | V                                   | 93.5         |                 |                 | OV                              |  |
|                                |                   |                    | 88.5 |                                     | 88.5         |                 |                 |                                 |  |
| Chand <i>et al.</i> 2005       | Im                | LPS                | 29   | C                                   | 100          |                 |                 | OV                              |  |
|                                |                   |                    | 105  | I                                   | 96.11        |                 |                 |                                 |  |
| Funk <i>et al.</i> 2005        | Im                | BCSP               | 13   | Card Test y cultivo                 | 100          |                 |                 | CA                              | Animales infectados con<br>10 <sup>7</sup> UFC de <i>B. melitensis</i><br>16M  |
| Minas <i>et al.</i> 2005       | C                 |                    | 166  | C                                   | 97.59        | 96.25           | 99.23           | OV                              |  |
|                                |                   |                    |      |                                     | 96.39        | 93.55           | 99.23           |                                 |  |
| Nielsen <i>et al.</i> 2008     | I                 |                    |      |                                     | 98.6         |                 |                 | OV                              |  |
|                                | C                 |                    | 71   |                                     | 97.2         |                 |                 |                                 |  |
|                                | C-P               |                    |      |                                     | 98.6         |                 |                 |                                 |  |
|                                | I                 | LPS                |      | C                                   | 92.6         |                 |                 |                                 |  |
|                                | C                 |                    | 583  |                                     | 84           |                 |                 |                                 |  |
|                                | C-P               |                    |      |                                     | 98.6         |                 |                 | CA                              |  |
| Nielsen <i>et al.</i> , 2005a  | I                 |                    |      |                                     | 96.2         |                 |                 | CA                              |  |
|                                | C                 | LPS                | 716  | BPAT y CFT                          | 93.6         |                 |                 |                                 |  |
| Tittarelli <i>et al.</i> 2006  | Im                | LPS                | 16   |                                     | 81           | 57              | 93              | OV                              | 394 días tras la infección<br>experimental con <i>B.</i><br><i>melitensis</i> biovar 3 en<br>tercer mes de gestación<br>413 días tras la infección<br>429 días tras la infección |
|                                |                   |                    | 22   |                                     | 68           | 50              | 81              |                                 |  |
|                                |                   |                    | 22   |                                     | 95           | 81              | 98              |                                 |  |
| Portanti <i>et al.</i> 2006    | C                 | LPS                | 271  | RB/FC                               | 100          | 98.65           | 99.99           | OV-CA                           | Distribución Beta  |

| Estudio                               | Tipo <sup>a</sup> | Diana <sup>b</sup>      | N    | Criterio de referencia <sup>c</sup>               | Sensibilidad | 95% IC inferior | 95% IC superior | Especies Incluidas <sup>d</sup> | Observaciones      |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------------|------|---|--------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|--------------------|
| Minas <i>et al.</i> 2007              | I                 | LPS                     | 1904 | + al menos a 2 pruebas (RB, mRB, FC, CELISA)      | 98.2         | 97.6            | 98.8            | OV-CA                           |                    |
|                                       | C                 |                         | 2088 | + al menos a 2 pruebas (RB, mRB, FC, IELISA)      | 76.5         | 74.4            | 78.4            |                                 |                    |
| Minas <i>et al.</i> , 2008            | C                 | LPS                     | 2108 | + al menos a 2 pruebas (RB, mRB, FC, IELISA, FPA) | 77.9         | 76.1            | 79.7            | OV-CA                           |                    |
| Bosnakovski <i>et al.</i> , 2010      | I                 | LPS                     | 755  | RB/CF   | 98.5         |                 |                 | OV-CA                           | Sistema Bommeli    |
|                                       | I                 |                         |      |   | 96.6         |                 |                 |                                 | Sistema MKD        |
|                                       | Im                |                         |      |   | 94.6         |                 |                 |                                 | Sistema Bommeli    |
|                                       | Im                |                         |      |   | 95.6         |                 |                 |                                 | Sistema MKD        |
| Al-Mariri <i>et al.</i> , 2011        | I                 | LPS                     | 1228 | CFT   | 97.8         |                 |                 | OV                              |                    |
| Muktaderul Ahmed <i>et al.</i> , 2011 | I                 | LPS                     | 108  | CE  | 66.67        |                 |                 | CA                              |                    |
| Rahman <i>et al.</i> , 2013           | I                 | <i>B. abortus</i> bv. 1 | 1044 |   | 92           | 87.2            | 98.2            | OV                              | Análisis Bayesiano |
|                                       |                   |                         | 636  |   | 92.9         | 87.3            | 98.3            |                                 |                    |
| García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2014 | I                 | LPS                     | 53   | CFT + C   | 77.4         | 66.1            | 88.6            | OV                              | Idexx Laboratories |
|                                       | B                 |                         |      |   | 100          | 100             | 100             |                                 | Ingenasa           |
|                                       | C                 |                         |      |   | 100          | 100             | 100             |                                 | Svanova Biotech    |
|                                       | I                 |                         |      |   | 98           | 94.2            | 100             |                                 | Svanova Biotech    |

<sup>a</sup> Tipo de ELISA: I= indirecto, en suero; C= de competición, en suero; Im= indirecto, en leche; C-P= de competición con conjugado PAG; B= de bloqueo;

<sup>b</sup> CP28=proteína plásmica CP28/BP26/Omp28; LPS=lipopolisacárido de membrana; BCSP= extracto proteico de *B. melitensis* 16M;

<sup>c</sup> FC: Fijación de Complemento, H: zona/rebaño con historial libre de brucelosis, C:Cultivo, V: ovejas adultas vacunadas conjuntamente con Rev. 1 10-12 meses antes de toma de muestras, BPAT: Buffer Plate Agglutination Test, SAT: Serum Agglutination Test

<sup>d</sup> OV=ovejas, CA=cabras; OV-CA= ovejas y cabras

Tabla VII. Principales estudios sobre la especificidad de técnicas ELISA desarrolladas desde el año 2000 hasta la actualidad

| Estudio                        | Tipo <sup>a</sup> | Diana | N    | Prueba usada como comparador o referencia | Especificidad | 95% IC inferior | 95% IC superior | Especies incluidas <sup>b</sup> | Observaciones  |
|--------------------------------|-------------------|-------|------|---|---------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|--|
| Biancifiori <i>et al.</i> 2000 | C                 | LPS   | 1760 | FC  | 98.9          | 95.9            | 99.8            | OV-CA                           |  |
| Cloekaert <i>et al.</i> 2001a  | I                 | CP28  | 106  | H   | 93            |                 |                 | OV                              |  |
| Ferreira <i>et al.</i> 2003    | I                 | LPS   | 212  | C   | 100           |                 |                 | OV                              |  |
| Nielsen <i>et al.</i> 2004a    | I                 | LPS   | 994  | H   | 97.6          |                 |                 | OV                              |  |
|                                | C                 |       |      |   | 99.8          |                 |                 |                                 |  |
| Burriel <i>et al.</i> 2004     | I                 | LPS   | 228  | H   | 94.5          |                 |                 | OV                              |  |
|                                | C                 |       |      |   | 98.5          |                 |                 |                                 |  |
| Chand <i>et al.</i> 2005       | Im                | LPS   | 209  | H, C, RB y SAT                            | 100           |                 |                 | OV                              |  |
| Funk <i>et al.</i> 2005        | Im                | BCSP  | 134* | H   | 100           |                 |                 | CA                              | Se usó *leche de tanque de un total de 134 explotaciones |
| Minas <i>et al.</i> 2005       | I                 | LPS   | 851  | H   | 100           | 100             | 100             | OV                              |  |
|                                | C                 |       |      |   | 99.41         | 98.9            | 99.93           |                                 |  |
| Nielsen <i>et al.</i> 2008     | I                 |       | 576  | H   | 100           |                 |                 | OV                              |  |
|                                | C                 |       |      |   | 100           |                 |                 |                                 |  |
|                                | C-P               | LPS   |      |   | 100           |                 |                 |                                 |  |
|                                | I                 |       |      |   | 99.9          |                 |                 |                                 |  |
|                                | C                 |       |      |   | 99.9          |                 |                 |                                 | CA   |
|                                | C-P               |       |      |   | 99.6          |                 |                 |                                 |  |
| Nielsen <i>et al.</i> 2005a    | I                 | LPS   | 1497 | BPAT/CFT                                  | 99.7          |                 |                 | CA                              |  |
|                                | C                 |       |      |   | 99.4          |                 |                 |                                 |  |
| Tittarelli <i>et al.</i> 2006  | Im                | LPS   | 51   | H   | 100           |                 |                 | OV                              |  |
| Portanti <i>et al.</i> 2006    | C                 | LPS   | 856  | FC  | 100           | 99.57           | 100             | OV-CA                           | Distribución Beta  |
| Minas <i>et al.</i> 2007       | I                 | LPS   | 2154 | H   | 99.5          | 99.8            | 100             | OV-CA                           |  |
|                                | C                 |       |      |   | 98.5          | 98              | 99              |                                 |  |
| Minas <i>et al.</i> 2008       | C                 | LPS   | 2154 | H   | 97.2          | 96.4            | 97.8            | OV-CA                           |  |



| Estudio                               | Tipo <sup>a</sup> | Diana                   | N    | Prueba usada como comparador o referencia | Especificidad | 95% IC inferior | 95% IC superior | Especies incluidas <sup>b</sup> | Observaciones      |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------------|------|---|---------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|--------------------|
| Bosnakovski <i>et al.</i> , 2010      | I                 |                         |      |   | 99            |                 |                 |                                 | Sistema Bommeli    |
|                                       | I                 | LPS                     | 881  | RB/CF                                     | 99.4          |                 |                 | OV-CA                           | Sistema MKD        |
|                                       | Im                |                         |      |   | 99.5          |                 |                 |                                 | Sistema Bommeli    |
|                                       | Im                |                         |      |   | 99.8          |                 |                 |                                 | Sistema MKD        |
| Mukiaderul Ahmed <i>et al.</i> , 2011 | I                 | LPS                     | 108  | CE  | 92.38         |                 |                 | CA                              |                    |
| Rahman <i>et al.</i> , 2013           | I                 | <i>B. abortus</i> bv. 1 | 1044 |   | 99.5          | 98.7            | 99.9            | OV                              | Análisis Bayesiano |
|                                       |                   |                         | 636  |   | 96.5          | 96.2            | 97.3            | CA                              |                    |
| García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2014 | I                 |                         |      |   | 100           | 100             | 100             |                                 | Idexx Laboratories |
|                                       | B                 |                         |      |   | 100           | 100             | 100             |                                 | Ingenasa           |
|                                       | C                 | LPS                     | 65   | CFT + C                                   | 100           | 100             | 100             | OV                              | Svanova Biotech    |
|                                       | I                 |                         |      |   | 95.5          | 90.6            | 100             |                                 | Svanova Biotech    |

<sup>a</sup> Tipo de ELISA: I= indirecto, en suero; C= de competición, en leche; Im= indirecto, en suero; Im= indirecto, en leche; C-P= de competición con conjugado PAG; B= de bloqueo;

<sup>b</sup> CP28=proteína plásmática CP28/BP26/Omp28; LPS=lipopolisacárido de membrana; BCSP= extracto proteico de *B. melitensis* 16M;

<sup>c</sup> FC: Fijación de Complemento, H: zona/rebato con historial libre de brucelosis, C:Cultivo, V: ovejas adultas vacunadas conjuntamente con Rev. 1 10-12 meses antes de toma de muestras,

BPAT: Buffer Plate Agglutination Test, SAT: Serum Agglutination Test

<sup>d</sup>OV=ovejas, CA=cabras; OV-CA= ovejas y cabras

*E. Ensayo de Fluorescencia Polarizada (FPA)*

Inicialmente la técnica de FPA fue estudiada para el serodiagnóstico de *B. abortus* en ganado bovino (Nielsen *et al.*, 1996), investigándose después su aplicación para la detección de anticuerpos frente a *B. melitensis* en pequeños rumiantes (Minas *et al.*, 2005; Minas *et al.* 2007; Nicola *et al.* 2010; Nielsen y Gall, 2001; Nielsen *et al.*, 2004a; Nielsen *et al.* 2005a; Ramírez-Pfeiffer *et al.*, 2006; Ramírez-Pfeiffer *et al.*, 2007; Ramírez-Pfeiffer *et al.* 2008a; Stournara *et al.*, 2007), incluso en formato de microplacas (Minas *et al.*, 2007). Se basa en la medición mediante una luz fluorescente polarizada de la velocidad de rotación de una molécula marcada (que depende de su tamaño). Cuando se forma el complejo antígeno-anticuerpo el tamaño de la molécula resultante de esta unión es mayor que la del antígeno (menor de 50Kda si no existen anticuerpos en la muestra estudiada) por lo que la unión antígeno-anticuerpo se traduce en una disminución en la velocidad de rotación de la molécula. El antígeno empleado es OPS de *B. abortus* S1119.3 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), aunque se ha demostrado la utilidad del HN como antígeno para la prueba de FPA en cabras (Ramírez-Pfeiffer *et al.* 2008a; Ramírez-Pfeiffer *et al.* 2008b). Se considera una técnica rápida, económica y que sirve para detectar la infección por *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* en ganado bovino, ovino, caprino y porcino además de cérvidos y visones (Nielsen y Gall, 2001) y que permite reducir el número de falsos positivos asociados a la vacunación (Ramírez-Pfeiffer *et al.* 2008a; Ramírez-Pfeiffer *et al.* 2006). La muestra de partida puede ser suero, sangre o leche (Nielsen y Gall, 2001). La temperatura de los reactivos empleados en la prueba así como la temperatura a la que tiene lugar la reacción es un importante factor que puede afectar a los resultados y, por tanto, debe ser controlado (Minas *et al.*, 2007). En estudios comparativos con otras técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de BOC, se ha observado que posee al menos la misma eficiencia en el diagnóstico de brucelosis de pequeños rumiantes que las herramientas tradicionales (Nielsen *et al.*, 2004a), o incluso mayor (Minas *et al.*, 2005). Otros autores han destacado la posibilidad que ofrece esta prueba de acomodar el umbral de positividad en función de la situación epidemiológica donde se aplique (Ramírez-Pfeiffer *et al.*, 2007). Puede ser utilizada como prueba para el comercio internacional siendo validada mediante técnicas apropiadas de referencia, estableciéndose los puntos de corte adecuados (OIE, 2009b). La Opinión de la EFSA

sobre las pruebas diagnósticas empleadas en el diagnóstico de BOC consideró que la prueba de FPA así como el ELISA indirecto, el ELISA de competición y el RB modificado poseen una sensibilidad y/o especificidad adecuadas para el comercio intracomunitario (Anon, 2006).

#### *F. Test del anillo en leche (MRT, Milk Ring Test)*

El test del anillo en leche se basa en la detección de anticuerpos frente a *Brucella* spp. mediante el empleo de células de *B. abortus* S99 o S1119-3 teñidas con un colorante que contiene hematoxilina. Esta prueba se basa en la capacidad de la porción Fc de los anticuerpos (fundamentalmente IgG<sub>1</sub>) para unirse a los glóbulos de grasa de la leche cuando se produce la unión antígeno-anticuerpo. Debido a la menor densidad de los glóbulos grasos de la leche, estos ascienden a la superficie del tubo de leche. Cuando los glóbulos están unidos al complejo antígeno-anticuerpo, se produce una banda púrpura en la parte superior de la leche debido a que el antígeno está coloreado. Si no existen anticuerpos frente a *Brucella* spp. en la muestra no se produce tinción de la porción grasa de la leche (Hunter y Allen, 1972). El Manual de la OIE sobre animales terrestres (2009) considera la prueba del anillo en leche de tanque como una técnica ineficaz para el diagnóstico de la brucelosis en los pequeños rumiantes (OIE, 2009b) debido a que el tamaño de los glóbulos de grasa es demasiado pequeño como para ascender a la superficie (Alton, 1990), aunque su posible aplicación (condicionada a la calidad de la muestra, la presencia de calostro en la muestra y la existencia de mastitis) (Al-Mariri *et al.*, 2011; Nielsen, 2002) sigue siendo objeto de estudio (Al-Mariri *et al.*, 2011; Hamdy y Amin, 2002).

**Tabla VIII.** Principales estudios sobre la especificidad de la técnica FPA desarrolladas desde el año 2000 hasta la actualidad

| Estudio                               | Diana <sup>a</sup> | Punto de corte (mP)                        | N    | Prueba usada como referencia <sup>b</sup> | Sensibilidad | 95% IC Sup. | 95% IC Inf. | Especies incluídas <sup>c</sup> | Observaciones  |
|---------------------------------------|--------------------|--|------|---|--------------|-------------|-------------|---------------------------------|--|
| Nielsen y Gall., 2001                 | OPS                | 78   | 71   | C   | 91.5         |             |             | OV                              |  |
| Burriel <i>et al.</i> , 2004          | OPS                | 88   | 1093 | BPAT y FC                                 | 94.9         |             |             | CA                              |  |
| Nielsen <i>et al.</i> , 2004a         | OPS                | Control negativo + 0.025                   | 155  | V   | 85           |             |             | OV                              |  |
| Nielsen <i>et al.</i> , 2005          | OPS                | 77.8                                       | 72   | C   | 91.7         |             |             | OV                              |  |
| Nielsen <i>et al.</i> , 2005          | OPS                | 88   | 716  | BPAT y FC                                 | 88.7         |             |             | CA                              | Se llevó a cabo en sangre con anticoagulante EDTA  |
| Minas <i>et al.</i> , 2005            | OPS                | 103  | 528  |   | 92.3         |             |             |                                 |  |
| Minas <i>et al.</i> , 2005            | OPS                | 87   | 166  | C   | 97.59        | 95.26       | 99.92       | CA                              |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2006 | OPS                | 89   | 587  | ≥2 pruebas (RB, mRB, FC, IE, CE)          | 95.9         | 94          | 97.4        | CA                              |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2006 | OPS                | 89   | 1488 | CT/FC                                     | 82.1         | 80.1        | 84          | CA                              |  |
| Minas <i>et al.</i> , 2007            | OPS                | Valor medio del control de la placa + 15mP | 1933 | ≥2 pruebas (RB, mRB, FC, IE, CE)          | 95.9         | 94.9        | 97.7        | OV-CA                           | En microplacas   |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2007 | OPS                | 108  | 242  | IE y CE                                   | 57.7         |             |             | CA                              |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2007 | OPS                | 98   |      |   | 78.1         |             |             |                                 |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008 | HN                 | 88   |      |   | 87.6         |             |             |                                 |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008 | HN                 | 101  | 381  | C o P o IE y CE                           | 87.5         |             |             | CA                              | En animales vacunados con Rev.1 detectó un menor número de seropositivos usando FPA-NH comparado con FPA-OPS y RBT |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008 | OPS                | 98   |      |   | 79.4         |             |             |                                 |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008 | HN                 | 86   | 48   | C (n=8) o PCR (n=40)                      | 95.7         |             |             |                                 |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008 | HN                 | 107.5                                      | 1009 | CT y FC                                   | 79.5         |             |             | CA                              |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008 | OPS                | 86   | 48   | C (n=8) o PCR (n=40)                      | 91.3         |             |             |                                 |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008 | OPS                | 107.5                                      | 1009 | CT y FC                                   | 75.9         |             |             |                                 |  |
| Minas <i>et al.</i> , 2008            | OPS                | Valor medio del control de la placa + 15mP | 2108 | ≥2 pruebas (RB, mRB, FC, IE)              | 95.9         | 94.9        | 96.7        | OV-CA                           |  |
| Nicola <i>et al.</i> , 2010           | OPS                | 87   | 96   | C+BPAT+SAT                                | 98.1         | 89.9        | 99.7        | CA                              |  |

<sup>a</sup>HN=Hapteno nativo; OPS: Cadena O del lipopolisacárido.

<sup>b</sup>FC: Fijación de Complemento, C.Cultivo, V: ovejas adultas vacunadas conjuntamente con Rev. 1 10-12 meses antes de toma de muestras, BPAT: Buffer Plate Agglutination Test; SAT= Serum Agglutination Test, RB: Rosa de Bengala, RBm: Rosa de Bengala modificado, IE: ELISA indirecto, CE: ELISA de competición, P: PCR; CT3: Card Test 3% concentración celular

<sup>c</sup>OV=ovejas/CA=cabras/OV-CA=ovejas y cabras

**Tabla IX.** Principales estudios sobre la especificidad de la técnica FPA desarrolladas desde el año 2000 hasta la actualidad.

| Estudio                               | Diana <sup>a</sup> | Punto de corte (mP)                      | N                        | Prueba usada como referencia <sup>b</sup>                | Especificidad          | 95% IC Sup. | 95% IC Inf.   | Especies incluidas <sup>c</sup> | Observaciones  |
|---------------------------------------|--------------------|--|--------------------------|--|------------------------|-------------|---------------|---------------------------------|--|
| Nielsen y Gall., 2001                 | OPS                | 78<br>88                                 | 1286<br>1817             | H<br>BPAT y FC   | 98.6<br>99.4           |             |               | OV<br>CA                        |  |
| Burriel <i>et al.</i> , 2004          | OPS                | Control negativo + 0.025                 | 228                      | H  | 96                     |             |               | OV                              |  |
| Nielsen <i>et al.</i> , 2004a         | OPS                | 77.8                                     | 994                      | H  | 89.5                   |             |               | OV                              |  |
| Nielsen <i>et al.</i> , 2005          | OPS                | 88<br>103                                | 1497<br>528              | BAPT y FC  | 98.9<br>61.6           |             |               | CA                              | Se llevó a cabo en sangre con anticoagulante EDTA  |
| Minas <i>et al.</i> , 2005            | OPS                | 87                                       | 851<br>587               | H<br>≥2 pruebas (RB, mRB, FC, IE, CE)                    | 98.94<br>98.9          | 98.26<br>98 | 99.63<br>99.5 | OV                              |  |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2006 | OPS                | 89<br>712                                | 1094<br>712              | CT y FC<br>H   | 82.2<br>95.8           | 79.8<br>94  | 84.4<br>97.1  | CA                              | Muestras CT negativas  |
| Minas <i>et al.</i> , 2007            | OPS                | Valor medio del control de la placa + 15 | 2154                     | H  | 97.9                   | 97.2        | 98.4          | OV-CA                           | En microplacas   |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2007 | OPS                | 108<br>88                                | 103                      | IE/CE  | 97.1<br>89.3<br>57.3   |             |               | CA                              | El empleo de OPS-FPA como técnica de confirmación incrementó un 22.5, 58.3 y 9% la especificidad de RB8, RB3 y FC.   |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008 | HN<br>OPS          | 101<br>98                                | 221                      | H <sup>a</sup> + NV(n=96) ó H <sup>+</sup> IE-CE (n=125) | 91.9<br>89.3           |             |               | CA                              | NH-FPA incrementó notablemente la especificidad de la interpretación en serie de RBT y BPAT comparada con la observada cuando OPS-FPA y CFT se usaban como técnicas de confirmación. |
| Ramírez-Pfeiffer <i>et al.</i> , 2008 | HN<br>HN<br>OPS    | 86<br>107.5<br>86<br>107.5               | 96<br>2039<br>96<br>2039 | H<br>CT y FC<br>H<br>CT y FC                             | 99<br>84.3<br>99<br>81 |             |               | CA                              |  |
| Minas <i>et al.</i> , 2008            | OPS                | Valor medio del control de la placa + 15 | 2108                     | H  | 97.9                   | 97.2        | 98.4          |                                 |  |
| Nicola <i>et al.</i> , 2010           | OPS                | 87                                       | 554                      | H+BPAT+SAT   | 92.8                   | 90.4        | 94.7          | CA                              |  |

<sup>a</sup> HN=Hapteno nativo; OPS: Cadena O del lipopolisacárido.

<sup>b</sup> FC: Filación de Complemento; C: Cultivo; V: ovejas adultas vacunadas conjuntamente con Rev. 1, 10-12 meses antes de toma de muestras; BPAT: Buffer Plate Agglutination Test; SAT= Serum Agglutination Test; RB: Rosa de Bengala; RBm: Rosa de Bengala modificado; IE: ELISA indirecto; CE: ELISA de competición; P: PCR; CT3: Card Test 3% concentración celular

<sup>c</sup> OV=ovejas/CA=cabras/OV-CA=ovejas y cabras

### *G. Otras técnicas serológicas para el diagnóstico de BOC*

La mayoría de estas técnicas [como TR-FRET (*Time Resolved Fluorescent Resonance Energy Transfer*) (McGiven *et al.*, 2009), el ensayo de Electroquimioluminiscencia (Thompson *et al.*, 2009), la Prueba de Flujo Lateral (Abdoel *et al.*, 2008), la prueba de inmunofiltración rápida enzimática (ERIFA) y no enzimática (NERIFA) (Buyuktanir *et al.*, 2012) y el AlphaLISA (McGiven *et al.*, 2008)) tratan de dar solución a las principales carencias que presentan las pruebas serológicas actualmente disponibles: reducir el coste, incrementar la especificidad, mejorar la versatilidad de la naturaleza de las muestras analizadas y permitir la diferenciación de animales infectados y vacunados (McGiven, 2013).

### ***Técnicas diagnósticas basadas en la respuesta inmune celular frente a B. melitensis***

#### *A. Prueba cutánea de la brucelina*

Consiste en la inyección subcutánea, normalmente en el párpado inferior (Alton, 1990), de un volumen aproximado de 50 µl de una mezcla de antígenos de naturaleza proteica generalmente extraídos de la cepa rugosa de *B. melitensis* B115 (Jones y Marly, 1975b) que produce una reacción de hipersensibilidad retardada (Tipo IV) (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000) en el caso de que el animal haya contactado previamente con el patógeno. Los antígenos de naturaleza proteica de *Brucella*, como la proteína ribosomal L7/L12 (Bachrach *et al.*, 1994), son los principales responsables de la reacción cutánea de hipersensibilidad. Es importante emplear una mezcla de antígenos libre del LPS propio de cepas lisas de *Brucella* para evitar la posterior inducción de reacciones cruzadas en las pruebas serológicas rutinarias usadas en pequeños rumiantes (Blasco *et al.*, 1994b) y evitar la posible aparición de reacciones inflamatorias inespecíficas mediadas por anticuerpos (Garin-Bastuji *et al.*, 2006) asociadas a la potencial toxicidad dérmica del LPS en animales sensibilizados (Jones, 1974). La lectura de la prueba suele realizarse 48 horas tras la inoculación (OIE, 2009b), aunque se ha sugerido que el momento óptimo sería a las 72 horas (Blasco *et al.*, 1994b). Se ha observado que el máximo número de animales positivos a esta prueba tras la inmunización con Rev. 1 suele observarse a las 3

semanas tras la inoculación (Fensterbank, 1985), disminuyendo después lentamente de modo que puedan detectarse animales reactivos al menos 20-24 meses tras la vacunación (Pardon *et al.*, 1989; Fensterbank, 1985). Aunque no se han hecho estudios específicos sobre el fenómeno de anergia en la prueba de la brucelina en pequeños rumiantes, Blasco *et al.*, (Blasco *et al.*, 1994b) observaron una disminución de la capacidad de reacción en animales positivos al test en los 24 días siguientes a la lectura de la prueba positiva. Se ha observado que las cabras suelen presentar reacciones más evidentes en la lectura, llegando a aparecer lesiones necróticas en el punto de inoculación (Fensterbank, 1985).

Esta técnica presenta una gran especificidad [aunque puede dar reacciones cruzadas con *B. ovis* (Alton, 1990) y *Ochrobactrum anthropi* (Velasco *et al.*, 1997)] y su uso está indicado en animales no vacunados (sobre todo para diferenciar falsos reactivos en áreas libres de brucelosis) (Ebadi y Zowghi, 1983; FAO, 2009; Garin-Bastuji *et al.*, 1998) como técnica complementaria a las pruebas serológicas (Fensterbank, 1985). Además se ha observado que esta técnica puede tener especial interés para detectar animales en estadios tempranos y crónicos de la infección (Alton, 1990; Fensterbank, 1985). Sin embargo, se considera que la relativamente baja sensibilidad de la prueba a nivel individual condiciona la validez de su interpretación a nivel de rebaño (Ebadi y Zowghi, 1983) siendo una técnica útil para la identificación de rebaños infectados en áreas de alta prevalencia (Fensterbank, 1985) y animales con infecciones crónicas (Kolar, 1984). En su interpretación deben considerarse siempre otros aspectos como el historial del rebaño, signos clínicos y resultados serológicos o bacteriológicos (OIE, 2009b). Es una prueba diagnóstica reconocida como técnica alternativa para el comercio internacional (OIE, 2009b) cuya utilidad ha sido puesta de manifiesto en la vigilancia de rebaños infectados con *Brucella* spp. (Kolar, 1995).

#### *B. Detección de Interferón gamma*

El Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) es la citoquina más importante en la RI celular contra *Brucella* (Jiang y Baldwin, 1993; Kim *et al.*, 2005). La utilidad de la

cuantificación de la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro* para monitorizar la RI celular frente a este patógeno ha sido estudiada en ganado bovino (Weynants *et al.*, 1995), porcino (Riber y Jungersen, 2007) y ovino (Durán-Ferrer *et al.*, 2004). La prueba consiste en la estimulación *in vitro* de sangre completa con un preparado antigénico de naturaleza proteica en las primeras horas tras la extracción de la misma, con el fin de cuantificar la cantidad de IFN- $\gamma$  producido tras la estimulación. Los linfocitos Th presentes en la sangre de los animales que hayan tenido un contacto previo con *Brucella* spp. producirán niveles de IFN- $\gamma$  significativamente mayores que los que se encontrarán en muestras de sangre de animales que no hayan tenido contacto con la bacteria. Los niveles de IFN- $\gamma$  suelen cuantificarse mediante la técnica ELISA, incluyéndose en la prueba otra muestra adicional de sangre de cada animal que es estimulada con un compuesto antigénicamente neutro (normalmente PBS) y que sirve para determinar el nivel basal de IFN- $\gamma$ .

Se ha observado que la respuesta de IFN- $\gamma$  inducida por la estimulación *in vitro* puede variar en función de la composición del antígeno empleado. De este modo, Durán-Ferrer *et al.* (Durán-Ferrer *et al.*, 2004) observaron que bacterias completas de cepas lisas de *Brucella* provocaban una respuesta de IFN- $\gamma$  en ovejas preñadas desafiadas con *B. melitensis* 53H38 de mayor magnitud y más homogénea que la observada cuando la estimulación se realizaba empleando proteínas citosólicas sin LPS. De cualquier forma, el número de estudios realizados sobre el potencial valor de esta técnica en el diagnóstico de la BOC es muy limitado (McGiven, 2013). Se ha sugerido el potencial valor que podría tener la detección del IFN- $\gamma$  como técnica complementaria a las técnicas serológicas rutinarias en el diagnóstico de la brucelosis en rumiantes debido a su rapidez, sensibilidad y especificidad en el caso de falsos reactores positivos (Weynants *et al.* 1995), aunque existe aún una cierta controversia sobre su utilidad real como técnica diagnóstica (Kittelberger *et al.*, 1997). Otro factor limitante de la aplicación de esta técnica a gran escala es la complejidad de su realización, ya que requiere el transporte al laboratorio de las sangres a analizar en un periodo de tiempo determinado tras su recogida, lo que dificulta su uso en condiciones de campo.



#### IV.II. B. Diagnóstico directo de la brucelosis ovina y caprina

El **diagnóstico directo** está basado en la detección del agente patógeno (normalmente mediante cultivo) o de su material genético [habitualmente por medio de reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)] en muestras clínicas de animales infectados. Considerando las limitaciones que ofrecen las herramientas serológicas en el diagnóstico de BOC, el aislamiento de *Brucella melitensis* es el método de referencia para la confirmación de la infección (Alton *et al.*, 1988; Ferreira *et al.*, 2003; OIE, 2009b) al menos a nivel de rebaño (Alton *et al.*, 1988) (unido a otras herramientas como la investigación epidemiológica y el historial clínico del rebaño) (Task force on monitoring animal disease eradication, 2009b). Además permite obtener información valiosa como la determinación de la(s) especie(s) y biovariedad(es) presente(s) en el rebaño o zona estudiada. Se recomienda su aplicación para mejorar la eficiencia de los programas de control y erradicación (FAO, 2009), sobre todo cuando los niveles de prevalencia de la enfermedad son muy reducidos (en las últimas etapas de los programas de erradicación de BOC) (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). Además del cultivo y las técnicas moleculares, la visualización microscópica mediante tinciones (por ejemplo tinción de Ziehl-Neelsen modificada y Koster modificada) (Alton, 1990) a partir de ciertas muestras clínicas (como frotis vaginales) constituye otra técnica que permite poner de manifiesto la presencia de bacterias del género *Brucella*. El principal problema de esta metodología es su falta de especificidad al existir otros agentes patógenos abortivos morfológicamente similares, como *Chlamydia abortus* o *Coxiella burnetii* (OIE, 2009b).

##### **A. Bacteriología**

La Organización Mundial de la Salud clasifica las bacterias del género *Brucella* como agentes de Riesgo III, siendo necesario realizar su manipulación (cultivos o muestras altamente contaminadas) en laboratorios que posean al menos un nivel 3 de contención biológica (OIE, 2009b). Las muestras de elección para la detección directa de *Brucella* spp. son: i) en el caso de animales vivos: hisopo vaginal, leche, placenta cuando es posible (normalmente en el periodo del parto-

aborto) y muestras del feto abortado, de producirse un aborto (especialmente pulmón, bazo y contenido estomacal) (Alton, 1990); y ii) post-mortem: bazo, ubre, útero, epidídimo y testículos (Blasco, 2004; FAO, 2009; Garin-Bastuji *et al.*, 1998; Garin-Bastuji *et al.*, 2006; Kolar, 1984; World Health Organisation, Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Organization for Animal Health, 2006). Considerando la naturaleza de las muestras de elección es necesario el uso de medios selectivos para su aislamiento, dada su fácil contaminación con otros agentes bacterianos que pueden dificultar el crecimiento de *Brucella* spp. (Garin-Bastuji *et al.*, 2006). La combinación de más de un medio de cultivo, normalmente medio Farrell (Farrell, 1974) y el medio Thayer-Martin modificado (ambos incorporan vancomicina y nistatina) maximiza las posibilidades de aislamiento de *B. melitensis* (Marín *et al.*, 1996). Además se ha observado que algunas especies de *B. melitensis* son sensibles a la bacitracina lo que incrementa la necesidad de combinar diferentes medios selectivos para optimizar las posibilidades de aislamiento (Blasco, 2004). El cultivo de las muestras clínicas en, al menos, dos placas de cada medio para cada muestra incrementa las posibilidades de aislamiento de *Brucella* (Blasco, 2010b). Al igual que los otros miembros del género *Brucella*, esta especie tiene requerimientos de biotina, tiamina y nicotinamida para su crecimiento. Aunque no es estrictamente necesario en el caso de *B. melitensis* (Garin-Bastuji *et al.*, 1998), la adición de suero o sangre (normalmente de caballo) al medio favorece el crecimiento de este grupo de bacterias (Alton, 1990; Garin-Bastuji *et al.*, 2006).

El cultivo de *Brucella* requiere la disponibilidad de instalaciones y personal especializado (OIE, 2009b), lo que limita en gran medida su aplicación a gran escala. Además la utilidad de la técnica está condicionada a la viabilidad de las bacterias en las muestras clínicas analizadas, así como al tipo y número de éstas (Garin-Bastuji *et al.*, 1998; Marín *et al.*, 1996;). La limitada sensibilidad del cultivo en ciertas situaciones (animales que no muestran signos clínicos, animales crónicamente infectados) y el tiempo requerido para la obtención de resultados definitivos (normalmente 10-14 días antes de considerar un cultivo como negativo) son otras dos restricciones que complican la aplicación de esta técnica en el contexto de un programa de lucha contra BOC (Adone y Pasquali, 2013; Al Dahouk *et al.*, 2003; McGiven, 2013). Por ello un resultado negativo en el cultivo de muestras clínicas no debe ser considerado como una evidencia definitiva que permita descartar la

infección (Durán-Ferrer y Paramio, 2005). Una vez observado un crecimiento compatible con *Brucella* spp. en un medio selectivo la identificación de las colonias puede realizarse mediante técnicas fenotípicas (tinción de Gram, oxidasa y ureasa) (Blasco, 2004). En ese caso la capacidad de *B. melitensis* (que al igual que otras especies lisas del género puede disociarse en colonias de morfología rugosa, intermedias e incluso mucoides en cultivos y, sobre todo, en subcultivos) de adquirir diferentes características morfológicas y poder patógeno puede resultar problemática para su clasificación a nivel de especie/biovar (Corbel, 1991; Garin-Bastuji *et al.*, 1998; Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

### ***B. Detección molecular***

El desarrollo de la técnica de la PCR (Mullis *et al.*, 1986) supuso una gran revolución en campos como el del diagnóstico molecular, forense, genético, etc. En el campo del diagnóstico bacteriano, la PCR permite la detección de forma rápida y sencilla de microorganismos intracelulares obligados (para cuyo aislamiento es necesario el uso de cultivos celulares o animales de laboratorio como *Coxiella burnetii*), patógenos de crecimiento lento (por ejemplo, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) o bacterias de nivel de bioseguridad 3 (como *Brucella melitensis*) a partir de muestras clínicas (Cetinkaya *et al.*, 1999; Garin-Bastuji *et al.* 2006). Desde 1990 (momento en el que se desarrolló la primera PCR para la detección de *Brucella*) (Fekete *et al.*, 1990), se han desarrollado un considerable número de técnicas moleculares para el diagnóstico de la brucelosis animal (Baily *et al.*, 1992; Da Costa *et al.*, 1996; Fekete *et al.* 1990; Fekete *et al.*, 1992; Herman y De, 1992; Kulakov *et al.*, 1992; Leal-Klevezas *et al.*, 1995; Redkar *et al.*, 2001; Rijpens *et al.*, 1996; Romero *et al.* 1995; Serpe *et al.*, 1999). A pesar de la elevada homología del material genético de las diferentes especies de *Brucella*, algunas técnicas de PCR permiten la identificación a nivel de especie/biovar e incluso la diferenciación entre cepas vacunales y de campo (Bricker y Halling, 1994; García-Yoldi *et al.*, 2006; Hinic *et al.*, 2009; Huber *et al.*, 2009; López-Goni *et al.*, 2008; Mayer-Scholl *et al.*, 2010; Mirnejad *et al.*, 2012). La primera PCR para la discriminación de *B. melitensis* de otros miembros del género fue descrita en 1994 (Bricker y Halling, 1994). Desde entonces se han diseñado muchas técnicas basadas en la reacción de PCR (IS-an-PCR, RFPL-

PCR, RAPD, PCR convencional, PCR en tiempo real) para la detección específica del agente causal de la BOC (Cloeckaert *et al.* 1996c; Ouahrani-Bettacche *et al.*, 1996; Probert *et al.*, 2004; Sifuentes-Rincon *et al.*, 1997; Tcherneva *et al.*, 2000) e incluso para la identificación de la cepa vacunal Rev.1 (Bardenstein *et al.*, 2002; Cloeckaert *et al.* 1996c; Cloeckaert *et al.*, 2002a). Sin embargo, el número de estudios realizados sobre muestras clínicas y productos derivados de ovejas y cabras es escaso (Amin *et al.*, 2001; Cetinkaya *et al.* 1999; Colmenero *et al.*, 2011; Ilhan *et al.*, 2007; Ilhan *et al.*, 2008; Leal-Klevezas *et al.* 1995; Leyla *et al.*, 2003; Samadi *et al.* 2010), lo que dificulta la estimación de su eficacia real en condiciones de campo (FAO, 2009; McGiven, 2013) considerándose actualmente como técnicas complementarias para la identificación bacteriana (OIE, 2009b). Varios autores han determinado que el uso de más de una diana molecular mejora la sensibilidad de la detección de *Brucella* spp. a partir de muestras clínicas (Mukherjee *et al.*, 2007). El rendimiento en el proceso de extracción de material genético determina sustancialmente los resultados obtenidos con esta herramienta molecular (Bricker, 2002; Dauphin *et al.*, 2009; Hamdy y Amin 2002; Leal-Klevezas *et al.* 1995; O'Leary *et al.*, 2006; Marianelli *et al.*, 2008; Romero y López-Goni, 1999; Tomaso *et al.*, 2010), debiéndose ajustar a la naturaleza de la muestra (Rantakokko-Jalava y Jalava, 2002).

Las principales ventajas que presenta la PCR son la posibilidad de detección específica de *Brucella* en muestras clínicas contaminadas con otros microorganismos y en muestras con bacterias no viables, la rápida obtención de resultados (normalmente en menos de 24 horas), y su posible aplicación a gran escala (especialmente si se disponen de equipos automatizados para la extracción de ADN) (Al Dahouk *et al.* 2003; Buyukcangaz *et al.*, 2011; Cortez *et al.*, 2001; Garin-Bastuji *et al.* 2006). Sin embargo, diferentes factores se han asociado a la existencia de resultados falsos negativos: existencia de inhibidores de PCR (Wilson, 1997), la presencia de grandes cantidades de ADN genómico del hospedador (Navarro *et al.*, 2002) y la fase de infección que afecta al número y localización de las bacterias (Ilhan *et al.* 2008; O'Leary *et al.*, 2006;). Además, la detección del ADN de *Brucella* spp. mediante PCR [ya sea convencional o PCR en tiempo real (RT-PCR)] requiere un equipamiento específico (termocicladores, equipamiento para la electroforesis en PCRs convencionales) con un coste elevado (especialmente en el caso de la RT-PCR), lo que convierte estas técnicas en una alternativa poco aplicable en países en

vías de desarrollo, donde la brucelosis suele ser un problema endémico. La reciente descripción de una técnica de detección de ADN basada en la amplificación isotérmica de secuencias de ADN específicas, la técnica LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) (Notomi *et al.*, 2000), podría solventar esos inconvenientes. Esta técnica ha demostrado ser al menos tan sensible y específica como las anteriores y puede realizarse disponiendo tan solo de un dispositivo capaz de mantener una temperatura constante (alrededor de 63°C), pudiendo realizarse la lectura del resultado de la prueba a simple vista mediante la adición de ciertos reactivos (Gill y Ghaemi, 2008; Parida *et al.*, 2008). Su mayor inconveniente radica en la complejidad del diseño de los oligonucleótidos específicos de la región a detectar, y en la dificultad de lograr la optimización de un protocolo. Al inicio de la presente tesis, se habían publicado dos trabajos sobre la aplicación de esta técnica para la detección directa de ADN de *Brucella* spp. (Lin *et al.*, 2011; Ohtsuki *et al.*, 2008). A pesar de los prometedores resultados que se han obtenido en estos trabajos, ambos adolecen de una limitada variabilidad y/o número de muestras clínicas empleadas para su validación.

Además de las técnicas moleculares puestas a punto para la detección de ADN, como la PCR o la LAMP, se han desarrollado técnicas de caracterización molecular que permiten el análisis genético en profundidad de estas bacterias llegando a diferenciar cepas no relacionadas epidemiológicamente. Estas herramientas de identificación y caracterización molecular (que normalmente requieren un aislamiento bacteriano previo) (Godfroid *et al.*, 2010) han permitido un gran avance en el campo de la epidemiología molecular. Técnicas como el RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Cloeckaert *et al.*, 1995; Cloeckaert *et al.*, 2001b), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Whatmore *et al.*, 2005), VTNR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Whatmore *et al.*, 2006) y MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*) (De *et al.*, 2009; Garcia-Yoldi *et al.*, 2007; Garofolo *et al.*, 2013; Le Fleche *et al.*, 2006), HOOF Prints (*Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger-Prints*) (Bricker *et al.*, 2003), PCR-HRM (*High Melting Resolution*) (Winchell *et al.*, 2010) y la detección de SNPs (*Single-Nucleotide Polymorphisms*) (Foster *et al.*, 2008; Gopaul *et al.*, 2008) basadas en el análisis detallado de ciertas regiones hipervariables del ADN bacteriano, permiten el tipado molecular de los miembros de este género bacteriano, permitiendo incluso detectar la

aparición de nuevas cepas en una zona determinada, establecer el origen de un brote, formular hipótesis sobre relaciones entre genotipos y patogenicidad, etc.

#### IV. III. Vacunación frente a *Brucella melitensis* en pequeños rumiantes

Desde que Edward Jenner describiera en 1796 la primera vacuna contra la viruela (causada por el virus Variola) este método ha sido ampliamente utilizado en la lucha contra las enfermedades transmisibles causadas por patógenos de diferente naturaleza (virus, parásitos, bacterias). En general, la vacunación suele estar dirigida a los sujetos más susceptibles a la enfermedad con el fin de estimular las defensas del individuo. Sin embargo en el caso de la brucelosis los animales objeto de vacunación son aquéllos menos susceptibles a la enfermedad (hembras primíparas no gestantes), mientras que la vacunación está totalmente contraindicada en los animales más susceptibles (hembras preñadas) (Nicoletti, 2010).

Diferentes autores (Godfroid *et al.* 2011; Olsen, 2013) han expuesto las características que debería presentar la vacuna ideal contra la brucelosis: i) conferir una inmunidad duradera y sólida en una sola dosis, ii) inducir una inmunidad cruzada con diferentes especies de género *Brucella*, iii) ser inocua para todos los individuos, iv) no producir interferencia diagnóstica con las pruebas serológicas empleadas tradicionalmente, v) ser avirulenta para el hombre y no portar resistencia alguna a antibióticos, vi) no producir contaminación ambiental, vii) ser estable y viii) ser económicamente viable. Por desgracia la 'vacuna ideal' propuesta por estos investigadores dista mucho de aquéllas actualmente disponibles para el control de la brucelosis animal. En el caso de la brucelosis de los pequeños rumiantes, la vacuna más efectiva disponible actualmente es la Rev. 1 (Blasco, 1997; Robinson, 2003) cuya eficiencia en la prevención del aborto y transmisión de brucelosis ha sido puesta de manifiesto, pero no así la prevención de la infección y la seroconversión tras la exposición a cepas de campo (Olsen, 2013). El éxito de la utilización de una cepa viva en la inmunización frente a BOC reside en el equilibrio entre una óptima colonización del hospedador que permita inducir una protección suficiente frente a

cepas de campo y un índice de replicación limitado que minimice la virulencia de la cepa vacunal (Elzer *et al.*, 2002). A pesar de que no se conocen los parámetros concretos para evaluar la protección inducida por una vacuna contra *B. melitensis*, se ha demostrado que una vacuna eficaz frente a *B. melitensis* debe estimular la RI innata, activar las células CD8+ y CD4+y generar una efectiva población de células de memoria (Olsen, 2013).

#### IV.III. A. *Brucella melitensis* Rev. 1

Actualmente la vacuna Rev. 1 es la única vacuna aceptada en la Unión Europea para la inmunización de pequeños rumiantes dentro de los planes de lucha contra la BOC. La vacunación con Rev. 1 suele ser la piedra angular del control de BOC en zonas donde la prevalencia de enfermedad es muy alta, donde existen sistemas extensivos para la explotación de los pequeños rumiantes donde la identificación y monitorización individual de cada animal es complicada, y/o en lugares con falta de recursos económicos donde el sacrificio de animales positivos (y la posterior indemnización) es inviable (Alton, 1990). Ha de tenerse en cuenta que a pesar de que esta vacuna se aplique de manera correcta, con una cobertura vacunal adecuada (al menos en el 90% de la población diana) y usando vacunas de calidad asegurada, han de pasar varios años (6-12 años al menos) (Smits, 2013) para observar los resultados de su aplicación en el control de BOC (Blasco, 2004; Durán-Ferrer y Paramio, 2005).

##### *Historia de la Rev. 1*

A mediados del S. XX los investigadores ya habían concluido que el único modo de inducir una inmunización efectiva contra *Brucella* spp. era provocar una infección controlada durante el tiempo necesario para que el hospedador desarrollara una resistencia relativa a reinfecciones posteriores (Herzberg y Elberg, 1953; Herzberg *et al.*, 1953; Herzberg y Elberg, 1955). Uno de los primeros inconvenientes que planteó esta estrategia fue el control de la infección activa en el hospedador causada por la cepa vacunal.



La primera aproximación a este problema se basó en la utilización de una cepa de *B. melitensis* cuyos requerimientos de crecimiento pudieran ser usados para controlar la extensión y severidad de la infección inducida (Herzberg y Elberg, 1953). La investigación se centró en el aislamiento de una cepa estreptomicina-dependiente: la administración de este antibacteriano en el hospedador inmunizado permitiría controlar la persistencia de la cepa vacunal el tiempo necesario para inducir la inmunidad deseada (Herzberg y Elberg, 1953). En 1953, Herzberg y Elberg consiguieron aislar una cepa estreptomicina-dependiente (E-D) a partir de la cepa 6056 de *B. melitensis*. Las siguientes investigaciones tuvieron como objetivo determinar la concentración de antibacteriano y otros requerimientos que aseguraran la viabilidad de esta cepa así como estudiar las características antigénicas de las cepas dependientes (que resultaron ser muy parecidas a las de cepas de campo de *B. melitensis* y *B. abortus*). La capacidad inmunógena de la cepa E-D se estudió en ratones (*Mus musculus*) (Herzberg y Elberg, 1953; Herzberg *et al.*, 1953), cobayas (*Cavia porcellus*) (Herzberg y Elberg, 1953; Herzberg *et al.*, 1953) y monos (*Macaccus rhesus*) (Elberg *et al.*, 1955a). Aunque se observaron diferencias a nivel anatomopatológico entre los ratones y cobayas inmunizados con la cepa E-D y aquellos inmunizados con bacteria muerta o no inmunizados tras un desafío con *B. melitensis* 6056 (Elberg *et al.*, 1955b), se observó que la administración del antibacteriano no incrementaba la capacidad de infección ni persistencia de la cepa vacunal (Herzberg *et al.*, 1953). La naturaleza intracelular de los miembros del género *Brucella* spp. (Herzberg y Elberg, 1953) y la incapacidad de la estreptomicina para penetrar en los leucocitos polimorfonucleares (Magoffin y Spink, 1951) constituían la explicación más probable del fenómeno observado. A la vista de estos resultados parecía obvio que la validez de las cepas estreptomicina-dependientes como estrategia de inmunización contra *Brucella* spp. no era la esperada.

La investigación se centró entonces en las cepas de *Brucella* no-estreptomicina dependiente (NE-D) crecidas a partir de la cepa E-D. La naturaleza de las reversiones a este antibacteriano se estudió en detalle en 100 cepas NE-D: 98 resultaron ser sensibles a la estreptomicina (crecían solo en medios libres de este antibiótico) y dos cepas fueron confirmadas como resistentes a este antibacteriano (Herzberg y Elberg, 1953). La virulencia de 15 de las cepas E-D aisladas se demostró mediante un bioensayo con cobayas y ratones inoculados con cepas E-D y NE-D



(Herzberg y Elberg, 1953). Comparando la capacidad de multiplicación y persistencia de estas cepas con las observadas tras la inoculación de *B. melitensis* 6015, se eligió la cepa Rev. 1 para desarrollar el resto de experimentos enfocados en este sentido (Herzberg y Elberg, 1955). Éste fue el primer paso de un largo camino hacia la consecución de una de las herramientas más eficaces en la lucha contra la BOC. La inducción de una protección eficaz frente a la infección por *B. melitensis* era un requisito esencial que esta cepa debía cumplir; así, la protección inducida por la Rev. 1 se demostró tanto en ratones como en cobayas (Herzberg y Elberg, 1953; Herzberg y Elberg, 1955). Considerando los buenos resultados obtenidos en los animales de laboratorio la siguiente especie animal en la que se probó la cepa Rev. 1 fue la cabra; se realizó un estudio comparativo de la protección conferida por esta cepa vacunal (en su forma viva e inactivada por calor) tras un desafío con un cepa virulenta (en el momento óptimo que evitara un problema de 'super-infección') (Elberg y Faunce, Jr., 1957). El siguiente paso fue su aplicación en un mayor número de individuos (ovejas y cabras) estudiando, además, aspectos como la duración de la inmunidad conferida (Alton, 1966; Alton, 1968; Entessar *et al.*, 1967; Erdem *et al.*, 1970; Unel *et al.*, 1969), la respuesta inducida por Rev. 1 en animales jóvenes (Alton, 1967; Elberg, 1959) y adultos (Falade, 1983; Jones *et al.*, 1973b; Worthington *et al.*, 1973), el efecto de la vacunación en hembras gestantes (Elberg y Meyer, 1958; Elberg y Faunce, Jr., 1962; Ne'eman, 1968b; Ne'eman, 1968a) y lactantes (Jones y Marly, 1975a) y, finalmente, la resistencia frente *B. melitensis* tras la vacunación con dosis estándar y reducidas (Alavi.Shoushtari, 1995; Alton, 1959; Alton *et al.*, 1972; Entessar *et al.* 1967; Gaumont *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1958; Jones *et al.*, 1964; Morgan *et al.*, 1966; Ne'eman, 1963; van Drimmelen, 1960). Otro aspecto objeto de estudio de la Rev. 1 ha sido su estabilidad, virulencia residual y la posibilidad de reversión a formas más virulentas (Alton *et al.*, 1967; Bosseray, 1991; Ne'eman 1968b) así como el efecto de diferentes dosis vacunales en la RI inducida (Alton, 1969a; Alton, 1969b; McCamish y Elberg, 1962). La duración de la inmunidad conferida tras la vacunación en pequeños rumiantes ha sido estudiada ampliamente con el fin de determinar la necesidad de la revacunación con Rev. 1. Se considera que la duración de la inmunidad equivale a la vida productiva media de las ovejas y cabras (Alton, 1966; Alton, 1968; Alton, 1987; Entessar *et al.*, 1967; Erdem *et al.*, 1970) (aunque la duración total de dicha inmunidad no se conoce con exactitud) (Moriyón *et al.*, 2004) y algunos autores aconsejan la revacunación en ambientes con

altas prevalencias de enfermedad (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). Los trabajos de Alton y Elberg (1967), Elberg (1981) y Elberg (1996) relatan detalladamente todos los pasos, descubrimientos e investigaciones que se siguieron desde la descripción de la Rev. 1 hasta su implementación en el campo.

### *Características y limitaciones de Rev. 1*

#### *1. Virulencia residual en los pequeños rumiantes*

Aunque la virulencia residual de Rev. 1 ha sido ampliamente reconocida desde hace tiempo (principalmente representada por su capacidad de inducir abortos), se han observado importantes diferencias en el grado de la misma reflejados en la diversidad de resultados obtenidos (Blasco, 1997; Bosseray, 1992). Bosseray (Bosseray, 1991) realizó un estudio en el modelo murino sobre la inmunogenicidad y la virulencia residual de cepas de Rev. 1 de distintos orígenes comprobando que existían importantes diferencias entre las cepas estudiadas. Como consecuencia de ello, la OIE recomienda realizar estrictos controles durante la producción de esta cepa vacunal con el fin de confirmar que mantiene las características de la cepa Rev. 1 Elberg de *B. melitensis* biovar 1 (OIE, 2009b). La virulencia residual de Rev. 1 se manifiesta en:

#### ❖ Efecto abortivo

La capacidad de la Rev. 1 para inducir abortos en hembras vacunadas durante la gestación fue puesta de manifiesto en los primeros experimentos realizados a mediados del siglo pasado (Elberg y Meyer, 1958; Elberg y Faunce Jr., 1962; Ne'eman, 1968b; Ne'eman, 1968a). Este efecto adverso es especialmente acusado cuando la vacunación se realiza en la mitad de la gestación (Zundel *et al.*, 1992) y puede además conllevar la excreción de la cepa vacunal en leche y secreciones vaginales (Blasco, 1997; Crowther *et al.*, 1977; Elberg y Faunce Jr, 1957; Jiménez de Bagues *et al.*, 1989; Ne'eman, 1968a). No obstante, y a pesar de que la excreción en leche ha quedado demostrada (Alton y Elberg, 1967), existen ciertas discrepancias sobre la relevancia de este fenómeno (Jones y Marly, 1975a; Ne'eman, 1968a).

Para evitar este efecto adverso de Rev. 1 se han planteado diferentes estrategias:

- ✓ Inmunización limitada a las ovejas y cabras de reposición (núlparas, no preñadas). Se considera que la inmunidad inducida por la Rev. 1 aplicada a dosis completas durante los 3-6 meses de edad es suficiente para asegurar la protección de los pequeños rumiantes durante toda su vida productiva (Alton, 1966; Alton, 1968; Alton, 1987; Entessar *et al.* 1967; Erdem *et al.*, 1970) aunque puede resultar insuficiente en determinadas condiciones (alta prevalencia de BOC, sistemas extensivos de manejo) donde la vacunación en sábana constituye una opción mejor (ver más adelante) (Blasco, 1997; FAO, 2009).
- ✓ Empleo de dosis reducidas de vacuna Rev. 1. Algunos autores han abogado por el uso de dosis reducidas como una buena alternativa vacunal considerando que la inmunidad conferida era adecuada y/o el número de abortos inducidos por la vacunación se reducía de manera considerable (Alton, 1970; Alton *et al.*, 1972; Díaz-Aparicio *et al.* 1994; Scharp *et al.*, 1999) permitiendo el control de brotes de la enfermedad (Blasco *et al.*, 1984b; Esteban-Velázquez, 1982). Sin embargo la aplicación de dosis reducidas de Rev. 1 ( $10^3$ - $10^7$ ) en el campo ha dado lugar a una divergencia de opiniones sobre su utilidad y repercusiones: muchos autores coinciden en que el número de abortos provocados y la escasa inmunidad inducida desaconsejan de forma concluyente la aplicación de esta estrategia en los programas de control de la BOC (Alton, 1970; Blasco 1997; Blasco, 2006; Crowther *et al.*, 1977; Fensterbank *et al.*, 1982a; Fensterbank *et al.*, 1985; Ferrer y Gil, 1994; Polydorou, 1975), incluso aplicada por vía conjuntival (Jiménez de Bagues *et al.* 1989). Por el contrario, algunos investigadores han apostado por la validez de esta aproximación (Delgado *et al.*, 1995a; Ebrahimi *et al.*, 2012; Kolar, 1984; Sales Henriques *et al.*, 1992) llegando a formar parte de los programas de lucha contra BOC en algunos países como Mongolia (Kolar, 1984), Kuwait (al-Khalaf *et al.*, 1992), Arabia Saudí (Al-Shamakh, 1995) y Turquía (Uysal, 1995). Los diversos resultados observados respecto al efecto de la vacunación con dosis reducidas y la patogenicidad de la vacuna Rev. 1 se podrían deber a diferencias en las cepas empleadas en los diferentes estudios (Blasco 1997; World Health

Organisation, 1997) y en el momento de gestación en el que se aplicó la vacuna (Blasco *et al.*, 1984b).

- ✓ Modificación de la vía de administración de la vacuna. Aunque se ha observado una reducción en el número de abortos cuando la Rev. 1 es aplicada por la vía conjuntival, el número de abortos desencadenados continúa siendo suficientemente elevado como para desaconsejar de manera rotunda la vacunación de animales preñados con Rev.1 por esta vía, incluso a dosis reducidas (Blasco, 1997; Jiménez de Bagues *et al.* 1989; Zundel *et al.* 1992).

❖ Otros efectos adversos

Se han observado otros efectos secundarios de Rev. 1 en ovejas y cabras, como un periodo transitorio de fiebre acompañado de un descenso del consumo de alimentos o una reacción local inflamatoria en el punto de inoculación (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000; Kolar, 1995). Algunos autores han observado un riesgo de diseminación en el ambiente de Rev. 1 tras la vacunación de animales jóvenes (incluso la excreción por ollares durante dos o tres semanas después de la vacunación) (Blasco, 2010c) lo que les convertiría en posibles fuentes de infección para otras especies animales (Ali Kojouri y Gholami, 2009; Banai *et al.*, 1995; Pishva y Salehi, 2012). Sin embargo, otros estudios han valorado que el riesgo de contaminación ambiental a partir de corderas vacunadas conjuntivamente es mínimo (Sales Henriques *et al.*, 1992; Stournara *et al.*, 2007; Zundel *et al.*, 1992). Por otro lado, se ha sugerido un posible efecto negativo de la Rev. 1 en la capacidad de concepción en cabras vacunadas en momentos cercanos a la monta, por ello, se recomienda dejar, al menos, dos meses entre la vacunación y la época de apareamiento (Alton, 1985a) (por el contrario, otros autores han descartado este efecto secundario de la vacunación) (Kolar, 1995). En el caso de la vacunación de machos, muchos autores han registrado una ausencia de reacciones adversas (no excreción de la cepa vacunal, no desarrollo de sintomatología clínica, no aumento de temperatura corporal, etc.) en corderos (Blasco *et al.*, 1987; Fensterbank *et al.*, 1982b, García-Carrillo, 1981; Marín *et al.*, 1990) tras la vacunación con Rev. 1 [incluso tras administrar la vacuna cinco veces de manera sucesiva (Erasmus y Bergh, 1985) y cuando es aplicada por la vía conjuntival (Munoz *et al.*, 2008)]. Por otro lado, se han

registrado un número escaso de efectos indeseados tras la vacunación como epididimitis en un carnero (Lantier y Fensterbank, 1985) y en un irasco (Tolari y Salvi, 1980).

## *2. Potencial zoonótico y resistencia a la estreptomycinina*

Se han registrado casos humanos esporádicos de brucelosis causados por esta cepa vacunal (Banai, 2002; Bardenstein *et al.* 2002; Blasco y Díaz, 1993; Squarcione *et al.*, 1990), si bien no se ha descrito ningún brote de enfermedad asociado a su empleo en el campo (Blasco, 2010c) pero sí asociado a su fabricación (Olle-Goig y Canela-Soler, 1987). La puesta en práctica de unas correctas prácticas de bioseguridad durante la vacunación y manipulación de la Rev. 1 reducen la posibilidad de infección para el hombre y el riesgo de contaminación ambiental. La resistencia a la estreptomycinina que presenta esta cepa es otro inconveniente importante ya que se trata de un antibiótico de elección en el tratamiento de la brucelosis en el hombre (Ariza *et al.*, 2007). Se ha demostrado que esta cepa vacunal es resistente a 2,5µg/mL de estreptomycinina y susceptible a 5UI de penicilina G (Alton y Elberg, 1967).

## *3. Inestabilidad de la cepa vacunal Rev. 1*

La posible inestabilidad de esta cepa se debe a su tendencia a la disociación a formas rugosas (Banai *et al.* 1995; Godfroid *et al.* 2011), lo que reduce su eficacia como vacuna. A nivel laboratorial se considera que la inclusión de suero (equino, bovino o de conejo) en el medio de cultivo (Alton, 1985a) y la limitación de la temperatura durante el proceso de esterilización del mismo (Alton, 1990) previenen dicha disociación. En el campo, la principal estrategia para minimizar este fenómeno es mantener la cadena de frío hasta el momento de inmunización de los animales (Menzies, 2012) (en ciertas circunstancias puede resultar complicado, lo que puede provocar la aplicación de vacunas de baja calidad y, por tanto, en un posible descenso en la inmunidad inducida). Algunos autores han sugerido una posible reversión de Rev. 1 a formas más patógenas (sin evidencias científicas concluyentes) (Banai *et al.*, 1995). Sin embargo, la estabilidad *in vivo* de Rev. 1 se ha demostrado

en ovejas y cobayas (Ne'eman 1968b). Rev. 1 presenta una mutación que afecta al gen *rpsL* (Cloeckaert *et al.*, 2002a) y posiblemente otras no conocidas hasta la fecha (Godfroid *et al.*, 2011) lo que limita las posibilidades de cambios en su atenuación (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). Adicionalmente, la estabilidad de la Rev. 1 ha sido puesta de manifiesto mediante la técnica MLVA (García-Yoldi *et al.*, 2007; Le Fleche *et al.*, 2006).

#### 4. Interferencia diagnóstica con pruebas serológicas rutinarias (RB, FC, ELISA)

Los anticuerpos frente al LPS de Rev. 1 (de fenotipo liso) inducidos tras la vacunación (que pueden ser detectados hasta cuatro años tras la vacunación dependiendo de la edad de animal, la ruta y dosis de inoculación y la técnica serológica empleada para detección de la respuesta post-vacunal) (Alton 1968; Banai *et al.* 1995; Delgado *et al.*, 1995b; Jiménez de Bagues *et al.* 1992; Marín *et al.* 1999; Stournara *et al.* 2007) son indistinguibles de los anticuerpos producidos por el hospedador tras una infección por *B. melitensis* (y otras cepas lisas de *Brucella* spp.) (OIE, 2009b). Por ello la vacunación da lugar a una interferencia diagnóstica en la estrategia de erradicación basada en el sacrificio de animales reactivos a pruebas serológicas (RB, FC, ELISA), lo que dificulta la combinación de estas dos medidas en la lucha contra la BOC (Alton, 1990; Garin-Bastuji *et al.*, 2006;).

Se han descrito tres posibles soluciones para evitar este problema de interferencia:

- ❖ Minimización de la respuesta serológica inducida tras la vacunación con Rev. 1. mediante:
  - Reducción de la dosis de inmunización (dosis reducidas) con el fin de disminuir la respuesta serológica inducida (si bien esta alternativa presenta los inconvenientes mencionados anteriormente en el apartado 'Empleo de dosis reducidas de vacuna Rev. 1').
  - Modificación de la vía de inoculación: la vía subcutánea se ha usado de manera tradicional para la aplicación de Rev. 1 en ovejas y cabras dando lugar a una inmunidad sólida y a una fuerte y prolongada respuesta serológica

(de al menos 20 meses) (Alton *et al.*, 1984). Del mismo modo que se demostró para la vacuna S19 frente a la brucelosis bovina causada por *B. abortus* (Fensterbank y Plommet, 1979; Plommet y Fensterbank, 1976; Plommet y Plommet, 1976), se ha evidenciado la utilidad de la vía conjuntival como ruta de inmunización de Rev. 1 en ovejas y cabras (Fensterbank *et al.*, 1982b; Fensterbank *et al.*, 1987; Jiménez de Bagues *et al.*, 1992; Marín *et al.*, 1990). A pesar de que la vacunación conjuntival con Rev. 1 provoca una respuesta serológica más reducida, una dosis de  $10^9$  UFC aplicada por dicha vía en corderos/cabritos (animales menores de 6 meses) es capaz de inducir una protección suficiente como para garantizar su protección frente a un desafío experimental sin necesidad de realizar revacunaciones (Fensterbank *et al.*, 1985) (al menos durante dos gestaciones posteriores a la vacunación) (Verger *et al.*, 1995). La respuesta serológica inducida tras la inmunización conjuntival de animales adultos es mayor que la observada cuando los animales son vacunados a edades tempranas (Fensterbank *et al.*, 1982a; Jiménez de Bagues *et al.*, 1989; Marín *et al.*, 1990; Stournara *et al.*, 2007) pero menor que la observada tras la vacunación subcutánea (Blasco, 2010a; Delgado *et al.*, 1996; Fensterbank *et al.*, 1985)

De cualquier forma, la vacunación conjuntival de animales adultos puede dar lugar a problemas de interferencia en las campañas de erradicación basadas en el sacrificio de los animales reactivos ya que algunos animales adultos pueden aparecer como reactivos en pruebas serológicas (RB o ELISA indirecto) hasta 11 meses tras la vacunación (Stournara *et al.*, 2007) e inducir un importante número de abortos (ver apartado '*Empleo de dosis reducidas de vacuna Rev. 1*'). La vacunación conjuntival puede plantear una serie de problemas inherentes a esta técnica de administración, ya que la dosis (aproximadamente 35µl) debe aplicarse en forma de gotas en la conjuntiva del animal, siendo imposible verificar si la totalidad de la dosis se ha inoculado correctamente (Figura X). Además es un método de vacunación laborioso, lo que implica una mayor lentitud a la hora de vacunar un gran número de animales, situación frecuente en las campañas de vacunación contra BOC. Por último, la liberación de la vacuna en forma de

gotas puede favorecer la formación de aerosoles, lo que redundaría en una mayor exposición del personal encargado de la vacunación.



**Figura X.** Oveja inmunizada con Rev. 1 por vía conjuntival. Se suele incorporar un colorante (azul de Evans, por ejemplo) que facilita su correcta aplicación.

- ❖ Desarrollo de una técnica diagnóstica que permita la diferenciación de animales infectados por *B. melitensis* (cepa de campo) y vacunados con Rev. 1.

Diversas investigaciones se han centrado en la identificación de proteínas de *Brucella melitensis* y otros antígenos (diferentes al LPS) con el suficiente poder inmunógeno para inducir una respuesta serológica que permitiera diferenciar animales vacunados e infectados. A pesar de que los resultados obtenidos con algunas de estas técnicas pueden resultar prometedores, existe una serie de inconvenientes que dificultan la posible implementación de estas técnicas en el contexto de un programa de control y erradicación de BOC (debido a la marcada variabilidad individual de la RI detectada, la ausencia de estudios de sensibilidad y especificidad de estas técnicas en diferentes condiciones epidemiológicas, la menor intensidad de la respuesta serológica observada frente al LPS, etc.) (Salih-Alj *et al.*, 1996). Esta situación explica la limitada aplicación que estas técnicas serológicas han tenido hasta la fecha. Algunos de los antígenos estudiados han sido:

- Antígenos de naturaleza proteica: el reconocimiento de la existencia de proteínas de la membrana externa implicadas en la respuesta humoral inducida tras la infección por *B. melitensis* supuso el primer paso para el diseño y desarrollo de técnicas serológicas basadas en antígenos diferentes al LPS



(Zygmunt *et al.*, 1990; Zygmunt *et al.*, 1992; Zygmunt *et al.* 1994b; Zygmunt *et al.*, 1994a). Zygmunt *et al.* (Zygmunt *et al.*, 1994b) pusieron de manifiesto una respuesta serológica de mayor intensidad y duración frente a ciertas proteínas de membrana (p.e. 25-27, 31-34 kDa) en ovejas infectadas con *B. melitensis* que aquella detectada en ovejas vacunadas con Rev. 1. Este hecho estaba posiblemente asociado a la mayor persistencia de las cepas de campo (capaz de inducir una respuesta serológica más intensa y duradera frente a dichas proteínas) (Zygmunt *et al.*, 1994b). Estudios posteriores profundizaron en la caracterización de proteínas de membrana de *B. melitensis* (que indujeran anticuerpos en animales infectados experimentalmente y de manera natural que no pudieran detectarse en animales vacunados con Rev. 1 o animales libres de *Brucella* spp.) e identificaron cinco proteínas citosolubles (19, 24, 28, 32 y 54 kDa) que cumplían este requisito (Debbbarh *et al.*, 1995).

Debbbarh *et al.* (Debbbarh *et al.* 1995) concluyeron que la proteína de 28kDa (previamente identificada en *B. abortus* con la misma finalidad) (Rossetti *et al.*, 1996) poseía características (como permitir la detección temprana de animales naturalmente infectados) que la hacían una candidata interesante.

Diferentes estudios posteriores se han centrado en el desarrollo de técnicas serológicas basadas en esta proteína de 28kDa (también conocida como CP28 y BP26) (Cloeckaert *et al.*, 1996a; Cloeckaert *et al.* 1996b):

➤ ELISA indirecto:

- Salih-Alj *et al.* 1996: estos autores detectaron el 80 y 89% de los animales infectados experimental y naturalmente, respectivamente, sin registrar respuesta alguna en animales vacunados ni en aquéllos libres de *B. melitensis*.
- Cloeckaert *et al.* 2001a: a pesar de que obtuvieron buenos resultados (especificidad: 93%; sensibilidad: 84-100%), la respuesta detectada fue más débil y retardada que la registrada usando como antígeno el O-PS. Además obtuvieron una débil respuesta en algunos animales vacunados con Rev. 1. Estos autores sugirieron que el diseño de una

cepa de Rev. 1 con una delección en el gen *bp26* aseguraría la diferenciación entre animales infectados y vacunados mediante el empleo de esta técnica (Cloeckaert *et al.* 2001a).

➤ ELISA de competición:

Debbbarh *et al.*, (1996) estudiaron 15 anticuerpos monoclonales frente a diferentes epítomos de la proteína CP28 para evaluar la capacidad de estas inmunoglobulinas para detectar la infección con *B. melitensis* mediante la técnica ELISA e identificar regiones inmuno-dominantes de la proteína estudiada. Estos resultados corroboraron la utilidad de esta proteína como marcador diferencial de la respuesta inducida por cepas de campo y cepas vacunales. Además observaron una respuesta serológica frente a CP28 más homogénea que la observada frente a otras proteínas de membrana externa de *B. melitensis* aunque, una vez más, era más tardía que la respuesta frente al LPS. Seco-Mediavilla *et al.*, (Seco-Mediavilla *et al.*, 2003) llevaron a cabo un estudio con el fin de mejorar la especificidad del diagnóstico de la BOC mediante la identificación de epítomos específicos de CP28 que incrementaban la especificidad de la detección de ovejas infectadas con *B. melitensis* en comparación a lo observado con la proteína completa.

- Antígenos de naturaleza polisacárida: el HN es un antígeno reconocido por el sistema inmune del hospedador durante la infección y cuya composición química es muy similar a la del LPS (Aragón *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 1984; Moreno *et al.*, 1987). Su utilidad en el diagnóstico de brucelosis animal se empezó a estudiar en el ganado bovino, donde se observaron diferencias en los resultados obtenidos entre animales infectados (un anillo de precipitación en una prueba de inmunodifusión radial) y vacunados (el anillo desaparecía siempre que la técnica se aplicara al menos dos meses después la vacunación) (Díaz *et al.*, 1979; Jones *et al.*, 1980) y entre animales infectados por *B. abortus* y por *Yersinia* (Fernández-Lago *et al.*, 1982). Se han obtenido resultados interesantes respecto a la utilidad de la inmunodifusión radial con HN en el diagnóstico de la BOC (Blasco *et al.*, 1984a; Díaz-Aparicio *et al.*, 1994; Díaz-

Aparicio *et al.*, 1996; Jiménez de Bagues *et al.*, 1992; Marín *et al.*, 1999) aunque ciertos autores han descrito problemas en la sensibilidad/especificidad de esta técnica cuando es aplicada a gran escala (Nielsen, 2002).

➤ Empleo de vacunas rugosas (carentes/defectuosas en O-PS) (Schurig *et al.*, 2002)

La necesidad de realizar estudios sobre vacunas vivas basadas en cepas rugosas para la inmunización de animales frente a *B. melitensis* fue una de las recomendaciones de la OMS sobre Desarrollo de Vacunas Nuevas/Mejoradas contra la Brucelosis (*WHO Consultation on the Development of New/Improved Brucellosis Vaccines*) (Cosivi y Corbel, 1998). Las formas rugosas (R) de *B. melitensis* pueden obtenerse: i) a través de una(s) mutación(es) espontánea(s) a partir de formas lisas (L) de *B. melitensis* y ii) mediante ingeniería genética alterando la secuencia de genes implicados en la síntesis/polimerización/transporte del L-LPS (Moriyon *et al.*, 2004). Por desgracia existen varios inconvenientes potenciales asociados al uso de vacunas rugosas que pueden dificultar su aplicación en el control de la BOC:

- ✓ La atenuación de las cepas R mutantes se ha relacionado con las alteraciones en la membrana externa y su interacción con las células (Jiménez de Bagues *et al.* 2004) y otros componentes (Rittig *et al.*, 2003) del sistema inmune del hospedador (González *et al.*, 2008). Este grado de atenuación puede ser tan alto que la protección inducida por la vacunación sea insuficiente (Godfroid *et al.*, 2011). No obstante, existen formas R naturales (*B. canis*, *B. ovis*) que son virulentas y dan lugar a una infección en el hospedador (Schurig *et al.*, 2002).
- ✓ La interferencia diagnóstica descrita para las cepas L vacunales podría no ser totalmente evitada con el uso de cepas R. Se ha descrito que los animales vacunados con cepas R pueden presentar reacciones positivas en aquellas técnicas que usan antígeno O-PS embebido o en suspensión, como ciertos ELISAs indirectos (Barrio *et al.*, 2009). No obstante, los animales infectados con estas cepas R no reaccionan en las pruebas clásicas usadas en las campañas de lucha contra la BOC (RB y FC) (Adone *et al.*, 2005; Adone *et al.*, 2008; Adone *et al.*, 2011a),

aunque se han obtenido algunos resultados controvertidos en el caso de cepas R con mutaciones en el gen *wzm* (Barrio *et al.*, 2009).

- ✓ El potencial efecto zoonótico que pueden presentar estas cepas R complicaría el diagnóstico de la enfermedad en el caso que se produjera una infección en personas. En caso de infección humana, las técnicas serológicas que se usan de manera rutinaria en el diagnóstico no serían de utilidad al basarse en la detección de anticuerpos frente al L-LPS y, por tanto, podrían darse casos de errores en el diagnóstico (Moriyón *et al.*, 2004). A pesar de ello también se pueden desarrollar técnicas específicas para monitorizar la respuesta serológica inducida por las cepas rugosas, como por ejemplo la prueba de FC para *B. melitensis* B115 (Adone *et al.*, 2008a) que podrían adaptarse a su empleo en medicina humana.

Algunos ejemplos de cepas rugosas de interés debido a su potencial uso como vacunas frente a *B. melitensis* son:

➤ *B. abortus* con mutación en el gen *wboA* (entre otras)

La RB51 (R: rugosa; B: *Brucella*; 51: número de identificación del laboratorio donde se aisló por primera vez) es una cepa estable de *B. abortus* resistente a la rifampicina obtenida a partir de pases múltiples de la cepa 2308 en medios con diferentes concentraciones de antibióticos (rifampicina o penicilina) (Schurig *et al.*, 1991). La protección inducida por la RB51 frente a la infección por *B. abortus* ha sido estudiada experimentalmente en ganado bovino (Cheville *et al.*, 1992; Cheville *et al.*, 1996b) y ganado porcino (Lord *et al.*, 1998). Esta cepa vacunal ha sido utilizada con éxito en la lucha frente a la rucelosis bovina (*B. abortus*) en diferentes países de todo el mundo como Argentina (Samartino, 2002), Portugal (Martins *et al.*, 2009) y España (Sanz *et al.*, 2010) en determinadas condiciones epidemiológicas (Schurig *et al.*, 2002), aunque su eficacia en la inducción de protección frente a *B. abortus* sigue siendo objeto de controversia (Moriyón *et al.*, 2004; Olsen, 2000).

En el caso de *B. melitensis*, los primeros estudios sobre la protección inducida por la cepa RB51 se realizaron en el modelo murino obteniéndose resultados prometedores (Hamdy *et al.*, 2002; Jiménez de Bagues *et al.*, 1994; Winter *et al.*, 1996). Como parecía lógico, el siguiente paso consistió en evaluar su eficacia en los pequeños rumiantes. En el caso del ganado ovino se demostró que la cepa vacunal RB51 no era capaz de inducir una protección adecuada para prevenir la infección por *B. melitensis* (el Idrissi *et al.*, 2001) ni por *B. ovis* (Jiménez de Bagues *et al.*, 1995). En cuanto al ganado caprino se ha demostrado la seguridad de esta cepa vacunal en hembras preñadas (Roop *et al.*, 1991; Soberon-Mobarak *et al.*, 2000), aunque los resultados obtenidos respecto a su utilidad en la inmunización frente a *B. melitensis* son controvertidos (Cosivi y Corbel 1998; Herrera *et al.* 2011; Martínez *et al.*, 2010; Moriyón *et al.* 2004).

➤ *B. melitensis* con mutación en el gen *rfbU* (o *wboA*)

La cepa VTMR1 se obtuvo a partir de *B. melitensis* 16M mediante la interrupción del gen *rfbU* (o *wboA*) que codifica la manosiltransferasa (implicada en el ensamblaje de la cadena O-PS) usando el trasposón 5. En el modelo murino se obtuvieron resultados interesantes en la protección inducida no sólo frente a la infección por *B. melitensis* sino también frente a cepas de *B. abortus* y *B. suis* (Winter *et al.*, 1996). Aunque la cepa VTMR1 no provocaba abortos ni interferencia diagnóstica en las pruebas serológicas tradicionalmente empleadas en el diagnóstico de BOC como la Rev. 1, la carencia de protección inducida frente a un desafío con *B. melitensis* 16M ( $10^7$  UFC) en las cabras vacunadas supuso el fin de las investigaciones en este sentido (Elzer *et al.*, 1998).

Nikolich *et al.*, (Nikolich *et al.*, 2010) estudiaron el efecto de delecciones en el gen *wboA/rfbU* (cepa WRR51) en la supervivencia de *B. melitensis* en macrófagos humanos y ratones. Además de esta mutación, produjeron una segunda delección que afectaba al gen *purEK* obteniendo la cepa WRRP1. Estos autores confirmaron que la mutación del gen *wboA* de *B. melitensis* 16M producía una disminución de la virulencia y del tiempo de persistencia de esta cepa en el modelo murino. Estas consecuencias fueron más notables en el caso de WRRP1 resultando en una mayor atenuación que podría resultar en una insuficiente estimulación de la RI del

hospedador (y con ello, una protección insuficiente frente a *B. melitensis*) (Nikolich *et al.*, 2010).

➤ *B. melitensis* con mutación en el gen *rpoB*

Se trata de cepas (RBM14, RBM17) resistentes a rifampicina obtenidas a partir del cultivo de cepas sensibles en medios con diferentes concentraciones de este antibacteriano. A nivel genético, la resistencia a rifampicina se reflejaba en alteraciones en la secuencia del gen *rpoB* (Adone *et al.*, 2005). La protección frente a un desafío con *B. melitensis* 16M inducida tras la vacunación de ratones con las cepas RBM14 y RBM17 fue equivalente a la observada en el caso de la Rev. 1 (y mayor que la de RB51). No hay constancia de que se hayan realizado estudios de estas cepas en pequeños rumiantes.

➤ *B. melitensis* con mutación en genes *wa*<sup>\*\*</sup> y/o *wzm*

González *et al.*, (González *et al.* 2008) estudiaron 14 mutantes obtenidos a partir de diferentes mutaciones en genes implicados en la síntesis o exportación del O-PS o el núcleo del L-LPS de *B. melitensis*. Los resultados más interesantes atendiendo a la capacidad de multiplicación, persistencia y eficacia para inducir protección frente a un desafío con *B. melitensis* en el modelo murino se obtuvieron con las cepas Bm16MR<sup>*wa*<sup>\*\*</sup></sup> y Bm16MR<sup>*wzm*</sup>, que presentaban mutaciones en los genes *wa*<sup>\*\*</sup> y *wzm*, respectivamente (genes implicados en la exportación de O-PS). La protección inducida por estos mutantes fue similar a la observada con la Rev. 1, aunque la dosis de vacunación necesaria fue 1.000 veces mayor. A pesar de que estos autores concluyeron que era necesario realizar estudios sobre el valor de estas vacunas rugosas en ovejas y cabras, también afirmaron que era poco probable que las cepas R que no inducen anticuerpos frente a L-LPS pudieran remplazar a Rev. 1 (González *et al.*, 2008). La validez de algunas de las cepas estudiadas (BmH38R<sup>*wbkF*</sup>, Bm16MR<sup>*wa*<sup>\*\*</sup></sup> y Bm16M<sup>*wzm*</sup>) como potenciales vacunas fue estudiada en ganado ovino (Barrio *et al.*, 2009). Las ovejas vacunadas con las cepas BmH38R<sup>*per*</sup>, Bm16MR<sup>*wa*<sup>\*\*</sup></sup> y Bm16M<sup>*wzm*</sup> presentaron una protección reducida (31-54%) frente al desafío con *B. melitensis* 16M comparada con la observada en los animales inmunizados con Rev.1 (100%) (Barrio *et al.*, 2009). Además algunos

animales inmunizados con las cepas rugosas fueron positivos al ELISA con LPS debido a las Igs inducidas frente al núcleo oligosacárido que expresaban las cepas R estudiadas. Considerando los resultados obtenidos, Barrio *et al.*, (Barrio *et al.*, 2009) concluyeron que las vacunas rugosas parecían tener un valor limitado en la lucha contra BOC.

Por otro lado, se ha evaluado la cepa B115 de *Brucella melitensis* (cepa rugosa natural de virulencia atenuada que presenta al menos una mutación en el gen *wzm*) (Adone *et al.*, 2011b; Jones *et al.*, 1973a) como candidato vacunal frente a BOC en ratones observándose que es capaz de inducir resistencia frente a *B. melitensis* 16M y otras especies de *Brucella* (*B. ovis* y *B. abortus*) aunque no frente a *B. suis* (Adone *et al.*, 2008b; Adone *et al.* 2011a).

### ***Aplicaciones de Rev. 1***

La vacuna Rev. 1 se ha empleado tradicionalmente para la prevención de BOC en los pequeños rumiantes (Alton, 1990; Blasco, 2010a). La utilidad de la vacunación con Rev. 1 como medida de control de BOC ha sido puesta de manifiesto en múltiples países como Malta (Alton 1987), Mongolia (Kolar, 1995; Zinsstag *et al.*, 2005), Grecia (Minas *et al.*, 2004), Kuwait (al-Khalaf *et al.*, 1992), Tayikistán (Ward *et al.*, 2012) y Macedonia (Kirandziski *et al.*, 2010).

Esta vacuna se suele aplicar en una dosis de 0.5-2\*10<sup>9</sup>UFC (OIE 2009b) por vía conjuntival en corderas de 3-8 meses de edad (Alton, 1990; Ávila-Calderón *et al.*, 2013; Banai, 2002). Esta estrategia vacunal permite minimizar los principales inconvenientes ya mencionados: evita los abortos inducidos por Rev. 1, a la vez que permite que los niveles de anticuerpos vacunales se reduzcan minimizando los reactores cuando los animales adquieren la edad adecuada para entrar en las campañas de lucha contra la BOC (Alton, 1990). Algunos autores (Blasco, 2010a; Kolar, 1995) consideran que es posible que la vacunación restringida a animales jóvenes pueda resultar de limitada eficacia en determinadas situaciones epidemiológicas (por ejemplo, zonas de alta prevalencia de enfermedad o en prácticas de nomadismo donde la localización de toda la población susceptible de

vacunación es muy complicado) (Blasco y Molina-Flores, 2011). Las posibles causas asociadas a este hecho han sido: i) insuficiente cobertura vacunal, ii) aplicación de vacunas de calidad insuficiente (este factor afectaría negativamente también a la eficacia de la vacunación de animales adultos) y iii) descenso de la protección inducida por la vacuna con el paso del tiempo (Robinson, 2003).

En estos escenarios epidemiológicos y, a pesar de los efectos adversos que conlleva, la vacunación en sávana se torna aconsejable ya que permite descender los niveles de enfermedad hasta límites en los que es posible aplicar otras medidas de erradicación en sustitución o complementariamente a la vacunación. En esta situación (prevalencia de rebaño superior al 10%) Blasco (Blasco, 1997) expone que la vacunación a dosis completas ( $10^9$  UFC) por vía conjuntival durante la época de lactación, al final de la época de partos o antes del periodo de cubriciones es la forma más oportuna para llevar a cabo la inmunización en sávana. Kolar (Kolar, 1995) describió la aplicación este método de vacunación estacional (antes de la época de cubriciones o inmediatamente después de la misma) para la inmunización en sávana de rebaños de pequeños rumiantes en Mongolia previniendo en gran parte los abortos causados por esta cepa vacunal.

En el caso de ovejas y cabras infectadas la vacunación no tiene ningún efecto terapéutico (Blasco, 2010a). Sin embargo se ha comprobado que la aplicación de Rev. 1 en animales adultos en un brote de enfermedad o rebaños infectados conlleva una reducción del número de abortos y excretores en leche/descargas vaginales así como del tiempo de excreción (Kolar, 1984), estando esta aplicación autorizada por la UE en situaciones de emergencia sanitaria (Durán-Ferrer y Paramio, 2005).



**Tabla X.** Medidas de control y/o erradicación que pueden ser aplicadas en una determinada unidad epidemiológica de intervención (rebaño, zona, etc.) en función de la prevalencia colectiva observada y otros factores a considerar (Fuente: JM Blasco en *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East, FAO technical meeting in collaboration with WHO and OIE, 2009 (FAO, 2009); Blasco, 2010 (Blasco, 2010a))

| Prevalencia colectiva       | Medidas indicadas   | Objetivo   |
|-----------------------------|---|--|
| Mayor de 10%<br>(Muy alta)  | Vacunación en sábana <sup>a,b,c,d</sup> ;   | Descender los niveles de prevalencia colectiva y un control efectivo de la enfermedad. |
|                             | - Vacunación de todo el rebaño (hembras y machos, evitando épocas de parideras) cada dos años descendiendo el número de animales susceptibles al 30-40% cada dos años. Identificación de todos los animales implicados.   |  |
| Apróx. 5%<br>(Moderada)     | - Vacunación en sábana sólo el primer año de aplicación del programa, en años posteriores sólo se vacunarían los animales de reposición (animales nuevos, y por tanto, susceptibles). Inmunización total en 8-10 años. Identificación de todos los animales, especialmente, de las hembras de reposición. | Conseguir niveles de 'libre de brucelosis'   |
|                             | Vacunación de corderas de reposición por vía conjuntival y estrategia de sacrificio de animales adultos reactivos. Identificación individual de todos los animales. Control efectivo de los movimientos animales.   |  |
| Menor de 1-2%<br>(Muy baja) | Estrategia de sacrificio de animales reactivos.   | Mantener niveles de 'libre de brucelosis'  |

<sup>a</sup> Considerando el estado reproductor de las hembras implicadas en el programa de vacunación.

<sup>b</sup> Esta medida también es aplicable si se practica el nomadismo.

<sup>c</sup> Blasco (1997; 2010) y Robinson, 2003 recomiendan evaluar la eficacia la vacunación efectuada (Blasco 1997; Blasco 2010a; Robinson 2003), por ejemplo, valorando la respuesta serológica post-vacunal- Según Blasco et al, 2010 deberían observarse más del 80% de reactivos al RB durante los 15-30 días después de la inmunización. Según Rodríguez Ferri y Crespo (2000) (Rodríguez Ferri & Crespo 2000) a los 20 días post-vacunación, más del 60% de animales inmunizados deberían ser seropositivos al RB.

<sup>d</sup> Rodríguez Ferri y Crespo (2000) (Rodríguez Ferri & Crespo 2000) sostienen que esta fase debe mantenerse al menos 10 años

También se ha demostrado la capacidad de la vacuna Rev. 1 para inducir una inmunidad cruzada con diferentes especies de género *Brucella*, como *B. ovís* y *B. abortus*:

- En el caso de *B. ovís* (principal agente de la epididimitis contagiosa del carnero) se ha estudiado el empleo de Rev. 1 en el control de la infección producida por esta especie rugosa de *Brucella* (Blasco *et al.*, 1987; Erasmus y Bergh, 1985; Galindo *et al.*, 2009; García-Carrillo, 1981; Gradwell y Van Zyl, 1975; Fensterbank *et al.*, 1982b; Marín *et al.*, 1990; Van Heerden y Van Rensburg, 1962). Se han observado resultados muy variables respecto a la protección inducida (40-100%) (Blasco, 1990). Numerosos estudios han evidenciado que la Rev. 1 evoca una protección adecuada frente a *B. ovís* cuando la inmunización se efectúa en corderos (Blasco *et al.*, 1987;

Fensterbank *et al.*, 1982b; Gradwell y Van Zyl, 1975; Marín *et al.*, 1990). En el caso de la vacunación de animales adultos, se ha observado que la inmunización por la vía subcutánea induce una protección significativamente superior a la observada cuando los animales son vacunados por vía conjuntival (Marín *et al.*, 1990), aunque se han observado resultados contradictorios respecto a la protección inducida por Rev. 1 en animales adultos (Gradwell y Van Zyl, 1975).

- o La eficacia de Rev. 1 frente a infecciones experimentales con *B. abortus* ha sido estudiada por diferentes autores en ganado bovino (Horwell y van Drimmelen, 1971; García-Carrillo, 1980) y cobayas (García-Carrillo, 1986). A pesar de que los resultados obtenidos hasta la fecha han sido interesantes (algunos autores han observado una mejora en la protección inducida por Rev. 1 comparada con la S19) (García-Carrillo 1980; Horwell y van Drimmelen, 1971; van Drimmelen y Horwell, 1964) y de que existe un fenómeno de emergencia de *B. melitensis* en ganado bovino en algunos países (Banai *et al.*, 1995), el uso de Rev. 1 en ganado bovino no está extendido debido a la necesidad de llevar a cabo más estudios para determinar otros aspectos como la seguridad y la protección inducida por Rev. 1 en esta especie (Godfroid *et al.*, 2011). A pesar de ello, el uso de la Rev. 1 en bovinos en situaciones de alto riesgo de infección por *B. melitensis* está aprobado en la Unión Europea (2002/598/EC).

#### IV.III. B. Otras vacunas frente a *B. melitensis*

La situación actual de la brucelosis causada por *B. melitensis* en la cabaña ganadera y el hombre en todo el mundo fomenta el desarrollo de investigaciones con el fin de conseguir una vacuna más segura contra este patógeno (Olsen, 2013). Además de las vacunas R mencionadas en el apartado anterior, existen otras vacunas que han sido consideradas como potenciales alternativas a Rev. 1. En todos los casos, la valoración de la eficacia de cualquier nueva vacuna frente a la BOC debe ser siempre comparada con la Rev. 1 (considerada como la vacuna de referencia) (OIE, 2009b). A pesar de que los resultados obtenidos con algunos de estos candidatos vacunales son prometedores, hasta la fecha, ninguno se ha

presentado como una alternativa factible a la Rev. 1 en ovejas y cabras (Blasco y Molina-Flores, 2011). Algunos de los candidatos estudiados son:

➤ ***B. melitensis* cepa 53H38.** Esta vacuna inactivada fue desarrollada por el grupo del Dr. Renoux en el Instituto Pasteur de Túnez en los años 50. La vacuna estaba preparada a partir de la cepa virulenta 53H38 de *B. melitensis* y se administraba a una dosis de  $10^{11}$  UFC/mL por la vía subcutánea en un adyuvante oleoso (Alton, 1987). Los primeros experimentos en cabras fueron desarrollados por Renoux *et al.* en 1957 quienes observaron una buena protección en los animales inmunizados (Renoux *et al.*, 1957). A pesar de que algunos estudios han puesto de manifiesto que la inmunidad inducida es buena, incluso similar a la de Rev. 1, esta cepa causa una prolongada respuesta serológica y una fuerte reacción local en el sitio de inoculación (Nicoletti, 1990b) lo que desaconseja su uso en las campañas de control de la BOC.

➤ ***B. suis* cepa 2.** Esta cepa ha sido ampliamente utilizada desde 1958 en China, donde fue desarrollada. La vacuna era administrada por vía oral en el agua de bebida a ovejas y cabras (Xin, 1986), aunque también se aplicó en vacas y cerdos. Comparada con la Rev. 1 esta cepa presentaba una serie de ventajas que la hacían interesante: i) no tenía un efecto abortivo en hembras preñadas, ii) no presentaba virulencia para el hombre (Xin, 1986) y iii) no inducía una respuesta serológica persistente (Nicoletti, 1990b). Bosseray y Plommet (Bosseray y Plommet, 1990) realizaron un estudio sobre la virulencia residual e inmunogenicidad de la vacuna S2 en ratones observando que esta vacuna era de menor virulencia que Rev. 1 y la protección conferida frente un desafío de *B. melitensis* 53H38 era similar a la de Rev.1 a corto plazo, aunque a largo plazo era menor (sugiriendo la necesidad de una revacunación) (Bosseray y Plommet, 1990). Por otro lado, Verger *et al.* (Verger *et al.*, 1995) observaron una deficiencia en la inmunidad inducida por S2 en ovejas preñadas, de tal modo que no se encontraron diferencias significativas en los resultados de protección en los animales vacunados con S2 y en los animales no vacunados.

➤ ***B. abortus* cepa S19.** Esta cepa lisa tradicionalmente empleada en las campañas de lucha contra *B. abortus* en ganado bovino, ha demostrado ser menos efectiva que Rev. 1 en la lucha contra *B. melitensis* en cabras (Morgan *et al.*, 1966).

- **Vacunas de ADN.** Estas vacunas están basadas en la inoculación de un plásmido o vector de expresión que contiene ADN codificante de uno o más antígenos de *Brucella* contra el que se desea inmunizar. A pesar de que algunos estudios han demostrado resultados interesantes en la inmunización contra *B. melitensis*, las evidencias a favor de su uso son insuficientes y, por tanto, no son una alternativa real a la Rev1 en este momento. Algunos de los candidatos estudiados hasta la fecha son: CP24 (Cassataro *et al.*, 2002; Cassataro *et al.*, 2005), *bp26* y TF (*Trigger Factor*) (Yang *et al.*, 2005), *omp21* (Gupta *et al.*, 2007), *omp25* y *p-ialB* (Commander *et al.*, 2007) y BAB1\_0278 (Sislema-Egas *et al.*, 2012).
- **Vacunas de subunidades o fracciones** (inoculación de preparaciones de determinados componentes del microorganismo objeto de inmunización). Se ha llevado a cabo diferentes estudios usando esta estrategia vacunal (Bhattacharjee *et al.*, 2002; Bhattacharjee *et al.*, 2006; Cassataro *et al.*, 2007), algunos de los cuales incluso han conseguido inducir una protección similar a la Rev. 1 en el modelo murino (Cassataro *et al.*, 2007). A pesar de las ventajas que presentan frente a la Rev. 1 (inocuidad, ausencia de inducción de falsas respuestas positivas, imposibilidad de reversión a formas más virulentas, etc.) (Ávila-Calderón *et al.*, 2013), es necesario llevar a cabo más estudios para evaluar la utilidad de estas vacunas, sobre todo en el hospedador definitivo (ovejas y cabras) en diferentes situaciones epidemiológicas.
- **Vesículas de membrana** (*Outer Membrane Vesicles*). De manera similar a lo observado en otras bacterias Gram negativas, se ha observado que *B. melitensis* puede producir estas vesículas de membrana que contienen proteínas, fosfolípidos, lipopolisacáridos y otros componentes periplásmicos (Gamazo *et al.*, 1989). El empleo de estas vesículas en la inmunización contra *B. melitensis* se ha estudiado en el modelo murino, incluso incluyendo Plurónico-85 como adyuvante (Jain-Gupta *et al.*, 2012), observándose niveles de protección frente a un desafío con *B. melitensis* similares a los de Rev. 1 (Ávila-Calderón *et al.*, 2012).
- **Cepas lisas mutantes de *B. melitensis*:**
- BP26: se trata de una cepa de *B. melitensis* Rev. 1 con una delección en el gen que codifica la proteína BP26. La protección inducida por esta cepa vacunal se estudió en ratones y en ovejas desafiadas con *B. melitensis* 53H38 en mitad de la gestación, obteniéndose unos niveles muy similares a los

observados en animales vacunados con Rev. 1 (Cloeckaert *et al.* 2001a; Cloeckaert *et al.*, 2004). Además la posibilidad que ofrece esta cepa de ser diferenciada de las cepas de campo (debido a la mutación en el gen *bp26*) la convierte en una candidata interesante (Jacques *et al.*, 2007).

- P39: esta proteína inmunodominante ha sido identificada como uno de los principales componentes de la brucelina y estudiada como potencial diana en el diagnóstico serológico de la brucelosis animal (Denoel *et al.*, 1997). Tibor *et al.*, (Tibor *et al.*, 1998) comprobaron que la cepa mutante Rev.1ΔP39 (construida a partir de *B. melitensis* Rev. 1 a la que se había inducido una delección en el gen P39) inducía una buena protección contra *B. melitensis* en el modelo murino.
  - *Omp25*: se trata de un cepa mutante de *B. melitensis* 16M en la que se provocó una disrupción del gen *omp25*. Edmond *et al.* han puesto de manifiesto que esta cepa es una alternativa segura para la inmunización de ratones y cabras (Edmonds *et al.*, 2002). Sin embargo, no se han publicado hasta la fecha resultados sobre su validez en el ganado ovino.
  - ΔpurE201: consiste en una cepa de *B. melitensis* 16M con una delección en el gen *purE*. Cheville *et al.* (Cheville *et al.*, 1996a) estudiaron la capacidad de persistencia de esta cepa en los ganglios linfáticos de cabras jóvenes inoculadas para inducir resistencia a la infección por vía subcutánea con una dosis  $16,16 \times 10^9$  UFC/animal. Aunque obtuvieron algunos resultados controvertidos (desaparecía de las cabras más lentamente que la cepa *B. melitensis* 16M), los resultados del estudio indicaron que esta cepa posee características interesantes (Cheville *et al.*, 1996a) que deberían estudiarse.
- **Vacunas vectoriales:** se tratan de sistemas biológicos que permiten la transferencia, expresión y replicación de uno o más genes en las células del hospedador diana. Recientemente se ha publicado un trabajo (Gupta *et al.*, 2012) donde se sintetizó una vacuna vectorial de *Escherichia coli* que expresaba la proteína BP26 de *B. melitensis*. Los resultados obtenidos respecto a proliferación linfocitaria, producción de IFN-γ y protección observada en ratones sugieren la utilidad de la realización de más estudios en este sentido.

➤ *B. melitensis* inactivada (pero metabólicamente activa): considerando la necesidad del uso de vacunas vivas para la inmunización contra *B. melitensis*, Magnani *et al.* (Magnani *et al.*, 2009) estudiaron el potencial uso de cepas que habían perdido su capacidad de replicación debido a la exposición a irradiación gamma pero que seguían siendo metabólicamente activas para la inmunización de ratones. Estos autores comprobaron que la protección inducida tras la vacunación era adecuada (comparada con la inducida por cepas inactivadas por calor) sin la virulencia residual propia de las vacunas vivas, lo que las podría convertir en una estrategia segura para la inmunización contra bacterias intracelulares como *B. melitensis* (Magnani *et al.*, 2009). A pesar de ello, es necesario estudiar en más profundidad el potencial valor de esta estrategia en la inmunización contra *B. melitensis*.

#### IV.IV Otros aspectos a considerar en los programas de erradicación y control de BOC

Existen una serie de aspectos que se deben tener en cuenta para valorar tanto la estrategia a adoptar en el control de esta enfermedad como el éxito de las medidas aplicadas (Adone y Pasquali, 2013; Alton, 1987; Blasco, 2010a; Blasco y Molina-Flores, 2011; Crespo, 1994; Crespo *et al.*, 2012; Durán-Ferrer y Paramio, 2005; FAO, 2009; Rodríguez Ferri y Crespo 2000; Smits, 2013):

- Conocer las especies de *Brucella* implicadas en la enfermedad así como otros posibles hospedadores infectados además de ovejas y cabras. Tener constancia del censo real de animales susceptibles y con significación epidemiológica y la distribución geográfica de los rebaños donde se encuentran (Crespo, 1994).
- Determinar la raza de los animales presentes y susceptibles a la enfermedad ya que se han observado diferencias en la resistencia a la enfermedad en función de este factor. En el caso de las ovejas existe una gran susceptibilidad a la BOC en razas lecheras (p.e. Awassi) mientras que otras razas de producción cárnica (p.e. Maltesa) son más resistentes a la enfermedad causada por *B. melitensis* (Alton, 1987; Scientific Committee on

Animal Health and Animal Welfare, 2001). Esta variabilidad en la respuesta a la infección puede afectar también a la respuesta a la vacunación. Por este motivo Alton (Alton, 1987) recomendó realizar un estudio previo en una determinada raza antes de vacunar frente a *Brucella* en el caso de desconocer la susceptibilidad de la misma a este patógeno.

- Tener conocimiento de las características socioeconómicas, geográficas y ganaderas (como el nomadismo, la trashumancia o el pastoreo) (Racloz *et al.*, 2013) de la zona afectada que puedan condicionar la aplicación de las medidas en la lucha contra la BOC.
- Conocer la situación epidemiológica del país o región donde se van a aplicar las medidas de control y erradicación con el fin de adaptarlas a las condiciones específicas de dicha zona (FAO, 2009; Smits, 2013) y definir la unidad epidemiológica de intervención (Blasco, 2010a). Según el informe de la Task Force Subgrupo de Brucelosis de 2009 (Task force on monitoring animal disease eradication, 2009a), la unidad epidemiológica de intervención en el contexto de la BOC la integran '*todos los animales manejados de tal modo que comparten el mismo riesgo de exposición a la brucelosis*'. En este punto es muy importante destacar que la utilización de pastos comunales supone un nexo de unión entre rebaños que los convierte en una misma unidad epidemiológica en la lucha contra BOC (Task force on monitoring animal disease eradication, 2009a). Es por ello que el acceso a estos pastos debe estar sometido a estrictas medidas de control (certificación del estado sanitario de los rebaños con acceso, diagnóstico serológico sistemático con el fin de detectar rápidamente posibles infecciones, etc.) (Crespo *et al.*, 2012).
- Establecer un sistema de vigilancia (Adone y Pasquali, 2013; Smits, 2013) que permita i) conocer la prevalencia de enfermedad y obtener información epidemiológica actualizada previamente a la intervención y ii) monitorizar el progreso de la enfermedad una vez se hayan iniciado las medidas de control así como después del cese de la vacunación. La elección de las técnicas diagnósticas empleadas es otro elemento decisivo en un sistema de vigilancia de BOC: conocer la sensibilidad, especificidad y valor predictivo



(directamente relacionado con la prevalencia de la enfermedad) son aspectos decisivos en el éxito de las medidas empleadas (Adone y Pasquali, 2013). La posibilidad de adaptar los umbrales de positividad de las técnicas a la situación epidemiológica de cada escenario permite optimizar el empleo de estas herramientas diagnósticas en el control o erradicación de BOC (Ramírez-Pfeiffer *et al.* 2006).

- Instaurar una estrecha colaboración entre los diferentes sectores implicados en el desarrollo de las campañas de erradicación y control (FAO, 2009; Crespo *et al.* 2012). Este proceso implica el compromiso del sector veterinario y las autoridades administrativas, así como de los propietarios/responsables de los rebaños para asegurar la correcta puesta en prácticas de los planes de lucha. Todas estas entidades son piezas fundamentales para el éxito de cualquier estrategia contra la enfermedad:
  - Las administraciones sanitarias deben garantizar el soporte económico y el asesoramiento que requiere el desarrollo de un programa contra BOC, las compensaciones económicas (si se lleva a cabo el sacrificio de animales reactivos) de acuerdo al precio de mercado de los animales, la disponibilidad de laboratorios de diagnóstico, la posibilidad de obtención de vacunas, la organización, administración y supervisión del programa, etc. (Crespo *et al.* 2012).
  - Los servicios veterinarios implicados son la base de cualquier programa de control y/o erradicación de BOC ya que sobre ellos recaen tareas como la identificación de rebaños objetos de control, la vacunación de los animales, saneamientos, etc. (Blasco, 2010a).
  - Los ganaderos/propietarios/responsables de los rebaños deben ser informados y necesitan comprender los beneficios de las medidas a aplicar con el fin de conseguir su implicación en la lucha contra esta enfermedad. Además deben ser conscientes de su papel en el desarrollo de estos programas asegurando su cooperación en los mismos (Crespo *et al.*, 2012).



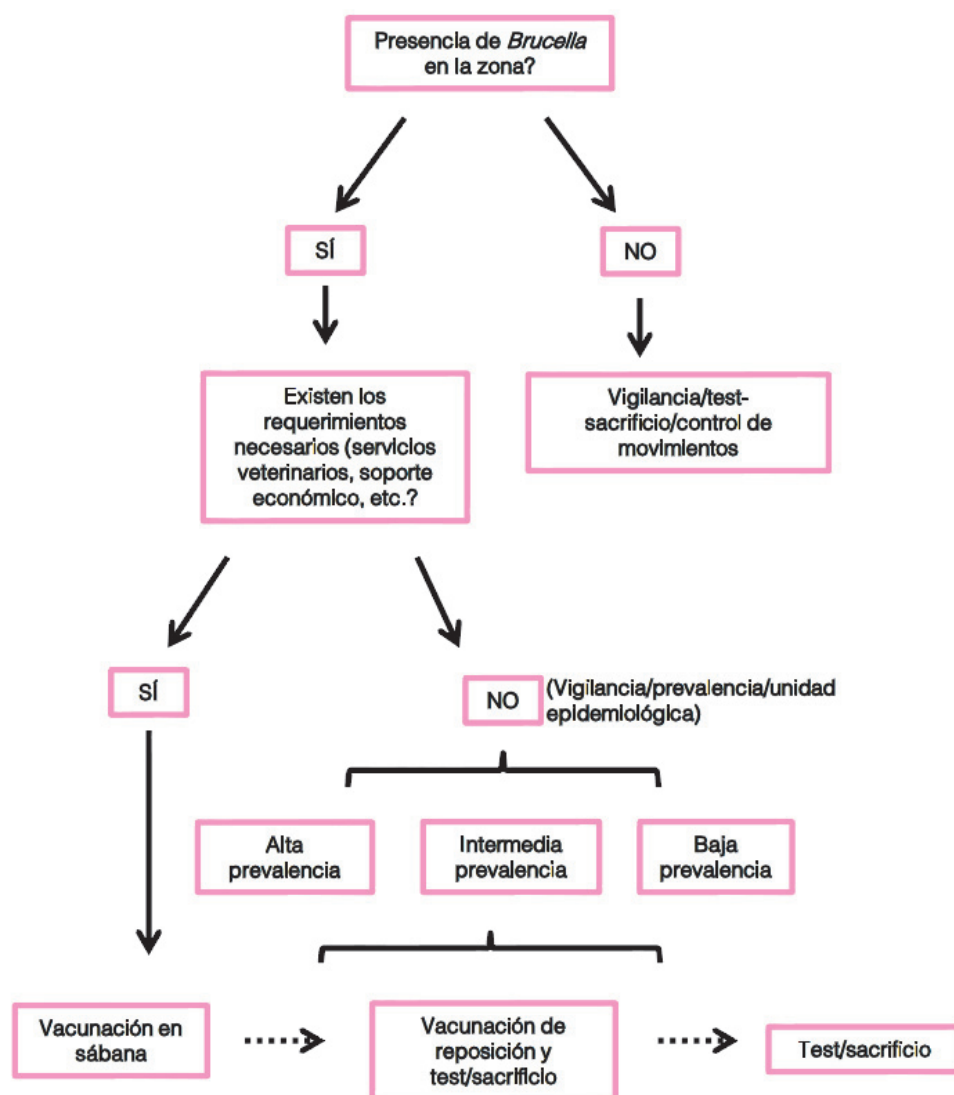
- Existir infraestructuras adecuadas (laboratorios de diagnóstico de referencia, mataderos apropiados, sistemas para registrar la información derivada de las medidas aplicadas que permita establecer indicadores del progreso del programa, factores de riesgo, etc.) que posibiliten la implantación de las medidas adoptadas en la lucha contra BOC (Crespo, 1994). Además es necesaria la existencia de una legislación sólida que permita la aplicación eficiente de las medidas de control establecidas en la zona de actuación. Por ejemplo, en el control de los movimientos animales (regulado por las Directivas 64/432/CEE y 91/68/CEE, entre otras) mediante el establecimiento de pruebas serológicas obligatorias antes del movimiento de animales e identificación individual tanto de los rebaños como de los animales (Smits, 2013). La UE (2003/623/EC) ha establecido un sistema electrónico (TRADE; *Trade Control and Expert System*) para el control de movimientos animales nacionales e internaciones (Crespo *et al.*, 2012).
- Ofrecer una educación sanitaria adecuada sobre la enfermedad (síntomas, vías de transmisión, etc.) en busca de una concienciación de la población sobre los beneficios de la vacunación de los animales (especialmente en regiones endémicas) y otras medidas de control de BOC tanto para el ganado como para su propia salud (FAO, 2009; World Health Organisation, Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Organization for Animal Health, 2006; Smits, 2013).

## V. PROGRAMAS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE BOC

Los programas de control de la BOC tienen como objetivo el descenso de la prevalencia de enfermedad, minimizando la exposición al agente etiológico e incrementando la resistencia a la infección de animales susceptibles (Adone y Pasquali, 2013). En cambio, las estrategias orientadas a la erradicación de la enfermedad están destinadas a la eliminación de la enfermedad y a minimizar las posibilidades de aparición (en lugares tradicionalmente libres de BOC) o re-aparición

(en regiones con historial de brucelosis) de esta patología (Blasco y Molina-Flores, 2011). La FAO (*Guidelines of coordinated human and animal brucellosis surveillance*) presenta una serie de directrices para diseñar, implementar y monitorizar un sistema de vigilancia de la BOC adaptado a la fase del programa de lucha (vacunación en sámana, vacunación restringida, etc.) y basado en el conocimiento sobre las especies animales afectadas, el grado de enfermedad en los principales reservorios, la definición de criterios específicos (unidad epidemiológica de intervención, los animales objeto de vigilancia, etc.), los sistemas de producción animal, la información sobre el número e identificación de los animales, rebaños, etc. (Robinson, 2003). La Figura XI esquematiza las posibles líneas de decisión para la aplicación de las diferentes estrategias existentes en función de la situación epidemiológica y otros factores propios de la zona de actuación.

Cuando el objetivo del programa es el control de la enfermedad, la herramienta de lucha más adecuada es la vacunación con Rev. 1 ya que permite incrementar la resistencia frente a la infección y reducir los efectos indeseables derivados de la misma en los animales (y como consecuencia indirecta, también en personas) (Blasco y Molina-Flores, 2011). La extensión, duración e intensidad de los programas de vacunación dependerá de diferentes factores como la prevalencia de rebaño en la zona de actuación, organización, disponibilidad y compromiso de los servicios veterinarios, recursos económicos, etc. como se ha detallado previamente (*'Otros aspectos a considerar en los programas de erradicación y control de BOC'*). Como medida general se considera que para que la vacunación sea efectiva debe mantenerse más de 10 años (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). La identificación individual de los animales inmunizados es un importante factor en el éxito de estos programas de inmunización, ya que permite comprobar el alcance de la cobertura vacunal adecuada para asegurar la protección de la población susceptible a la enfermedad, así como identificar fuentes de infección y movimientos ilegales de animales (Crespo *et al.*, 2012; Smits, 2013). La colocación de crotales en la oreja de los animales vacunados suele ser un método rápido y sencillo de identificación individual (Alton, 1990) aunque no exento de inconvenientes como su coste, la posibilidad de atraer moscas cuyas larvas pueden causar miasis y el riesgo de pérdida del crotal y, por tanto, errores en la identificación de los animales inmunizados con Rev. 1 (Blasco, 2010a).



**Figura XI.** Esquema de actuación para la toma de decisiones sobre el programa de lucha contra la brucelosis de los pequeños rumiantes en una determinada región o país (Adaptado de Garin-Bastuji, 2012. Comunicación oral: Brucellosis in Cattle, Sheep and Goats: Fundamentals of surveillance and eradication programs, Thailand-Japan Conference on Animal Health, the 25th Year Anniversary of National Institute of Animal Health, Bangkok, Tailandia, 30-31 Mayo de 2012).

En los últimos años, se han establecidos sistemas electrónicos (bolos ruminales, chips subcutáneos, crotales) que han permitido mejorar la identificación individual de los animales (Crespo *et al.*, 2012). Actualmente en Europa es obligatoria la doble identificación del ganado ovino y caprino, al menos uno de los cuales debe ser electrónico (RD685/2013, EC1782/2003, Directivas 92/102/CEE y 64/432/CEE).

Cuando, una vez transcurrido un periodo de tiempo suficiente (se considera que en el caso de la vacunación en sámana, ésta se debe mantener al menos 6-12 años antes de evaluar los resultados obtenidos), los indicadores epidemiológicos del estado sanitario de la cabaña ganadera respecto a BOC (número de casos descritos en humanos, prevalencia de rebaño, índices reproductivos, etc.) señalan un resultado satisfactorio de las estrategias adoptadas, se puede plantear el abordaje del siguiente paso en la lucha contra esta patología: la erradicación (Blasco, 2010a).

La erradicación conlleva como primer paso el descenso de los niveles de enfermedad hasta valores mínimos y suele abordarse en primer lugar mediante la vacunación restringida a hembras de reposición (3-6 meses de edad). Esta estrategia vacunal suele combinarse con el diagnóstico serológico en animales adultos y sacrificio de reactores. Teóricamente, la vacunación restringida a las hembras de reposición (que suponen aproximadamente el 15-25% de los animales) supondría que la totalidad del rebaño estaría inmunizada en 4-8 años (Blasco, 2010a). Sin embargo, en muchas condiciones (como los sistemas extensivos o de pastoreo), la estrategia de vacunación restringida a los animales de reposición puede resultar inaplicable (Blasco, 2010a) y, por tanto, la vacunación en sámana es la única estrategia vacunal viable. El paso de la vacunación en sámana a la vacunación restringida puede conllevar el sacrificio de un gran número de animales adultos que son reactores a las pruebas serológicas oficiales como consecuencia de los anticuerpos vacunales derivados de la inmunización masiva. Este paso debe ser planteado exclusivamente en zonas donde la prevalencia de BOC es cercana a 0 durante 6-12 años, donde exista un estricto control del movimiento de animales y una excelente identificación individual de los animales (Blasco, 2010a). Algunos autores (Blasco, 2010a; Blasco y Molina-Flores, 2011) han planteado dos posibles estrategias para abordar este problema y minimizar el sacrificio de animales sanos en este escenario:

- ✓ Suspensión de las pruebas serológicas oficiales durante los dos años posteriores a la prohibición de la vacunación en sámana. En caso de adoptar esta estrategia y con el fin de minimizar los efectos que pueda conllevar se deben adoptar las siguientes medidas complementarias:

- Vacunación individual por la vía conjuntival de todas las hembras y machos de 3-4 meses de edad
- Identificación individual de todos los animales
- Estricto control de movimientos

Una vez superados estos dos años, se procedería a reanudar el saneamiento de toda la población adulta (>12 meses) analizando los animales mediante las técnicas RB y FC, con el posterior sacrificio de los animales reactivos. Todos los rebaños que contengan al menos un reactor a la prueba de FC deben ser reanalizados hasta que la totalidad de la cabaña ganadera sea negativa a dos pruebas consecutivas.

- ✓ Realización de las pruebas serológicas oficiales en toda la cabaña ganadera inmediatamente después de la supresión de la vacunación en sábana mediante una prueba diagnóstica que permita diferenciar la respuesta serológica derivada de la vacunación con Rev. 1 en animales mayores de 12-16 meses (al menos 6-12 meses tras la supresión de la vacunación en sábana) de aquella inducida por una cepa de campo. La prueba de HN se ha presentado como una candidata posible para este fin si bien se considera que la sensibilidad de esta prueba es menor que la de las técnicas tradicionales empleadas en el control de BOC (Anon, 2006). Esta aproximación debe ser complementada con las estrategias anteriormente mencionadas (vacunación de la reposición, identificación individual, control de movimientos animales).

Como se indica en la Tabla X, cuando la prevalencia es cero (o cercana a cero) durante al menos una generación (y se ha minimizado la posibilidad de reintroducción de BOC), se puede plantear la supresión de la vacunación (excepto en determinados escenarios epidemiológicos) pasando a ser la piedra angular del programa de lucha la estrategia de test y sacrificio de animales positivos a las pruebas serológicas oficiales. El objetivo de los programas de lucha contra BOC en este escenario es la obtención del estatus de 'oficialmente libre de brucelosis' dadas las ventajas, sobre todo desde el punto de vista del comercio nacional e internacional, que conlleva. Factores como la cobertura vacunal, la puesta en práctica de medidas complementarias y un sistema de monitorización efectivo

pueden ayudar a decidir el momento del abandono de la vacunación (Smits, 2013). Según el RD2121/1993, una explotación de ganado ovino o caprina se considera oficialmente libre de brucelosis (*B. melitensis*) cuando:

- i) Todos los animales de las especies sensibles a *B. melitensis* no presentan signos de enfermedad desde más de 12 meses antes.
- ii) Los animales no se han sido vacunados con Rev. 1 u otra vacuna autorizada al menos desde dos años antes.
- iii) Todos los animales mayores de 6 meses de edad han sido negativos a dos pruebas (RB, FC) en un intervalo mínimo de 6 meses.
- iv) El rebaño está compuesto por animales nacidos en la explotación (tras realizar las pruebas serológicas) o procedentes de explotaciones oficialmente libres.

Según las directrices de la OIE (OIE, 2010), se considera una región como 'oficialmente libre' cuando: i) el 99.8% de los rebaños son calificados como oficialmente libres de brucelosis o no se han registrado casos de BOC en los últimos cinco años y la vacunación ha sido suspendida al menos tres años antes, ii) todos los rebaños están sometidos a un estricto control veterinario y iii) la aparición o sospecha de aparición de casos de BOC ha sido estrictamente notificada durante los últimos cinco años (al menos).

Los programas de erradicación sólo pueden ser planteados en aquellas regiones con bajos niveles de enfermedad que posean los recursos económicos (por ejemplo, para asumir las indemnizaciones por sacrificio de animales) y los servicios veterinarios (sistemas de vigilancia efectivos y de alta calidad, monitorización de movimientos animales, etc.) que este tipo de estrategias requieren (Alton, 1987; Blasco y Molina-Flores, 2011). Para la consecución (y mantenimiento) de este estado es necesaria la puesta en funcionamiento de exhaustivos programas de vigilancia sanitaria (incluyendo fauna silvestre si ésta supone un potencial riesgo epidemiológico) y la identificación individual de los animales (Blasco y Molina-Flores, 2011). La elección correcta de las pruebas diagnósticas empleadas en la vigilancia de BOC es otro elemento esencial para el éxito de esta medida (Adone y Pasquali, 2013). En función del objetivo deseado (maximizar la sensibilidad o la especificidad diagnóstica) puede contemplarse el uso de más de una prueba aplicadas en paralelo

(aumentando las posibilidades de detección de animales infectados) o en serie (incrementado la especificidad) (Minas *et al.*, 2007). En los programas de test y eliminación de reactores se recomienda analizar todos los animales adultos al menos una vez al año, realizar el sacrificio inmediato de animales reactores (pudiendo contemplarse el vacío sanitario de la explotación de origen de los mismos tras una adecuada evaluación del riesgo epidemiológico del rebaño) y volver a analizar los rebaños donde se ha detectado un animal reactor cada 1-2 meses (Alton, 1990). En líneas generales, se considera que el ELISA indirecto es una buena alternativa como prueba diagnóstica en los programas de vigilancia propios de zonas en vías de erradicación de BOC donde se ha abandonado la vacunación (Blasco y Molina-Flores, 2011).

### Programa de control y erradicación de BOC en Europa y en España

La Real Orden de 1917 y el posterior 'Reglamento de zoonosis transmisibles al hombre' del Decreto de agosto de 1917 supusieron el primer acercamiento legal al control de la brucelosis animal (Flores, 1978). En dichos textos se recogía una lista de enfermedades del ganado con potencial zoonótico reconocido como la rabia, la tuberculosis y la brucelosis (o Fiebre de Malta), y se establecían una serie de medidas sanitarias relativas a la declaración oficial, movimientos animales, etc. La Ley de Epizootias se reformó en 1929 y fue entonces cuando se empezaron a esbozar medidas de lucha contra la brucelosis de los pequeños rumiantes, incluyendo la prohibición de importación de animales de países con alta prevalencia de BOC.

En septiembre de 1933 se publicó el Reglamento de Epizootias que desarrollaba la anterior ley y donde se denominaba 'brucelosis B' a la brucelosis de los pequeños rumiantes en contraposición a la 'brucelosis A', término que designaba la enfermedad del ganado bovino y porcino. La Ley de Epizootias de 20 de diciembre de 1952 (y el Reglamento de 4 de febrero de 1955) supuso el siguiente paso en la lucha contra la brucelosis (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). Esta Ley tenía como objetivo *'evitar la aparición y difusión de las enfermedades epizooticas, esto es aquellas infectocontagiosas y parasitarias que atacan a los animales domésticos, y establecer las normas higiénicas y de sanidad indispensables para la conservación y mejora de la ganadería nacional'*. El texto incluye un capítulo específico sobre

Brucelosis (capítulo XXXI, artículos 262-269) y se designa a la brucelosis como enfermedad de declaración obligatoria. En esta Ley de 1952, y su correspondiente Reglamento, se abordaban diferentes aspectos del control de la enfermedad como el diagnóstico (como el artículo 25 que establecía las pruebas serológicas de aglutinación como técnicas diagnósticas para el ganado lanar o cabrío) y la necesidad de higienización de la leche procedente de explotaciones donde se hubieran detectado animales enfermos.

La Orden de 24 de mayo de 1965 estableció un plan de lucha contra la brucelosis caprina basado en el diagnóstico y sacrificio de reactores así como la desinfección de las estancias donde se albergaran los animales enfermos. Este plan tenía carácter obligatorio en Castellón, Valencia, Alicante, Almería, Murcia, Granada, Sevilla, Málaga, Cádiz y Huelva. En el resto de territorios se establecieron *‘equipos técnicos veterinarios necesarios para el estudio de las incidencias epizootológicas’* (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). En la segunda mitad de los años 70 se instauraron los programas de control de brucelosis de los pequeños rumiantes basados en la prevención de la infección de la cabaña ganadera sana mediante la vacunación de hembras entre los 3 y 6 meses de edad (la Rev. 1 se empezó a usar en España en 1973) (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). El principal inconveniente que se presentó fue un nivel de cobertura vacunal muy irregular en diferentes zonas del país (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). En los años 80 se establecieron medidas de control basadas en la vacunación masiva (dosis completas o reducidas, mediante la vía subcutánea) en las CCAA más afectadas y medidas de erradicación que incluían el diagnóstico y sacrificio de los animales positivos (Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos, 2012).

Sin embargo, no fue hasta la entrada de España en la CEE (cuando se aplicaron las medidas de control y erradicación de BOC de una manera masiva adaptándose la directiva 64/432/CEE) cuando se empezó a observar el verdadero impacto del control de la brucelosis animal en la sanidad animal y la salud pública. El número de casos de enfermedad por cada 100.000 habitantes es un buen indicador epidemiológico del impacto del control de la enfermedad en la cabaña ganadera. Así, en 1984 (cuando los programas de lucha contra la BOC se instauraron de manera irregular en las diferentes comunidades) se registró una incidencia acumulada de más de 22



casos por cada 100.000 habitantes (Durán-Ferrer y Paramio, 2005). En cambio, hoy en día esta incidencia se ha reducido a menos de la décima parte (Durán-Ferrer y Paramio, 2005).

A nivel europeo la BOC se empezó a considerar una enfermedad de interés prioritario para la hoy denominada Unión Europea a partir de 1988, no sólo por su gran impacto en la salud pública, sino también por las importantes repercusiones económicas que conllevaba su presencia (creación de barreras sanitarias con otros estados miembros). En 1990 se materializó la necesidad de establecer programas sanitarios en todos aquellos países miembros de la CEE donde la BOC suponía un grave problema mediante la adopción de la Decisión del Consejo 90/242/CEE y la Decisión 90/638/CEE (eur-lex.europa.eu) sobre la acción financiera comunitaria para la erradicación en los ovinos y caprinos (en España, Italia, Portugal, Grecia y Francia) y la obligatoriedad de extender estos programas de control y erradicación de brucelosis a todo el estado español. La importancia de estas medidas se derivaba de la relevancia de esta enfermedad no sólo para animales sino también para los humanos, el obstáculo que supone para los movimientos animales, las limitaciones para el comercio que conlleva, la necesidad de la instauración de un programa de erradicación, medidas sanitarias específicas, compensaciones económicas que permitan la eliminación rápida de animales infectados, así como un sistema de notificaciones de la evolución de la enfermedad (Crespo, 1994).

Cuando se pusieron en práctica los programas de control y erradicación de BOC en los diferentes países se observó que los resultados obtenidos no eran los esperados debido a ciertas deficiencias y factores (regiones con altas prevalencias donde la aplicación inmediata de las medidas dictadas no eran factibles) que dificultaban la realización de los mismos (Blasco, 2010b).

Dicha situación se convirtió en uno de los aspectos a tratar dentro de las nuevas estrategias que adoptó la UE para maximizar la seguridad alimentaria y, con ello, la protección de la salud (Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria, 1999) (European Union, 1999). Como quedó recogido en el Libro Blanco para lograr su objetivo principal *‘Se deberán proseguir y, en la medida de lo posible, reforzar los programas existentes de erradicación y lucha contra las enfermedades (por*

*ejemplo los aplicados en el caso de la tuberculosis y la brucelosis), sobre todo en aquellos Estados miembros en los que la situación al respecto sigue siendo problemática. Se prestará especial atención a la lucha contra la hidatidosis y la brucella melitensis en las regiones mediterráneas.* Para ello, se tomaron una serie de medidas complementarias (diciembre 2000) que suponían un incremento del apoyo económico y técnico en la lucha contra esta patología. En concordancia con esas medidas, se constituyó un grupo de trabajo específico para BOC que se conoce como Task Force subgrupo de brucelosis ([ec.europa.eu](http://ec.europa.eu)) y se compone de un grupo de expertos que realizan un seguimiento de los programas nacionales, evaluando y optimizando las estrategias para el control y erradicación de la BOC en los diferentes estados miembros donde la enfermedad supone un problema (Durán-Ferrer y Paramio, 2005). Desde su creación, este grupo de expertos se ha reunido tres veces en España con el fin de evaluar el plan de erradicación para BOC implantado en nuestro país y realizar recomendaciones para su optimización, emitiendo los correspondientes informes (Córdoba (2001): [ec.europa.eu](http://ec.europa.eu); Ciudad Real (2003): <http://ec.europa.eu>; Valladolid (2009): [ec.europa.eu](http://ec.europa.eu))

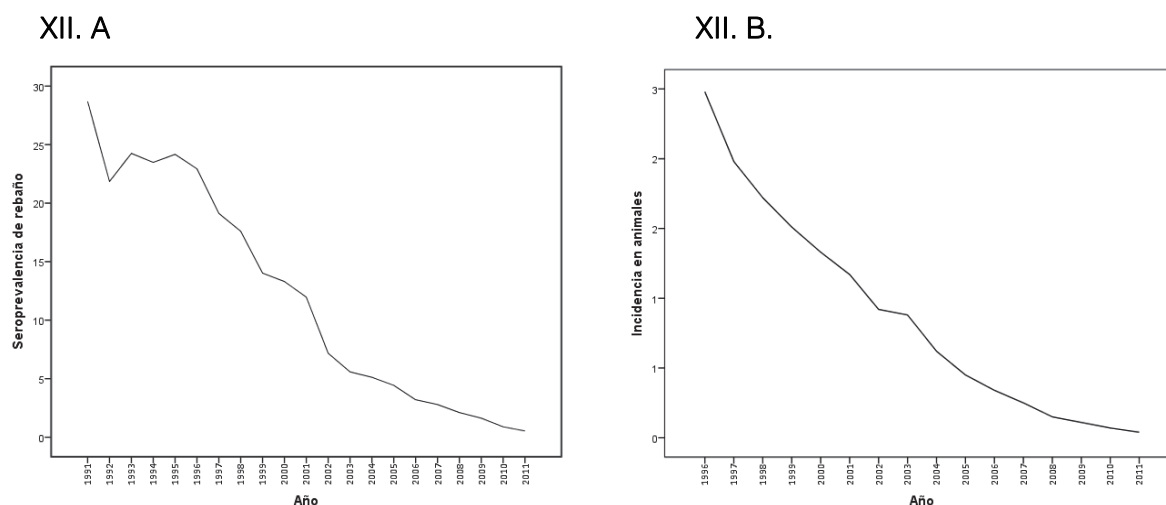
Desde el año 2000 (Decision 2000/5/EC), España cuenta con una co-financiación económica por parte de la Unión Europea para ejecutar el Programa de Erradicación de BOC (gastos referentes a pruebas diagnósticas, animales muestreados, animales vacunados) siendo la ayuda económica para 2014 no superior a 7.715.000 € (Official Journal of the European Union, L 328/101).

Además de la *Task Force* la Comisión Europea encomendó a la Oficina Alimentaria y Veterinaria (Food and Veterinary Office) la misión de controlar la ejecución de estos programas (Durán-Ferrer y Paramio, 2005). Desde la creación de una lista única de enfermedades de declaración obligatoria (EDO) por parte del Comité Internacional de la Organización Mundial de Sanidad Animal (en mayo de 2005), la BOC se encuadra entre las EDO de ovinos y caprinos. En España la brucelosis de los pequeños rumiantes (*B. melitensis*) es una enfermedad de los animales de declaración obligatoria cuya notificación se regula por la ley 8/2003 de 24 de Abril, de Sanidad Animal y el RD617/2007 de 16 de mayo.

En lo que hace referencia a nuestro país, el RD2611/1996 y su modificación por el RD 1047/2003 y RD51/2004 regulan el Programa Nacional de Control y

Erradicación de BOC. El objetivo principal de estos RD es *‘establecer las normas para la elaboración, planificación, coordinación, seguimiento y evaluación de los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales que serán de obligado cumplimiento en todo el territorio del Estado’*. Además establece el Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe (Granada) como el Laboratorio Nacional de Referencia para la brucelosis en animales. Las medidas, especificaciones e indicaciones adecuadas referentes a las medidas para el control y erradicación de la BOC se resumen anualmente en el Plan Nacional de Erradicación de la Brucelosis Ovina y Caprina que publica el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad). El principal objetivo del Plan de Erradicación para BOC para el año 2014 ([rasve.mapa.es](http://rasve.mapa.es)) es: *‘la declaración mediante Decisión comunitaria de regiones o provincias como oficialmente indemnes si cumplen los criterios necesarios y obtener niveles de erradicación de la enfermedad en las CCAA de baja prevalencia a corto plazo (99,8% de explotaciones oficialmente indemnes, sin casos confirmados durante 5 años y prohibida vacunación durante 3 años) y el control a corto plazo de la misma mediante vacunación junto con medidas de erradicación en CCAA de alta prevalencia’*. En las Tablas XI y XII se detallan las medidas comunes y específicas, respectivamente, que deben aplicarse en las comunidades autónomas en función de su situación epidemiológica para el año 2014. En el RD1047/2003 (de 1 de agosto, por el que se modifica el RD 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales) se definen las diferentes calificaciones que pueden tener las explotaciones de ovino y caprino en función de su estado sanitario y otras variables para BOC: M<sub>1</sub> (estado sanitario desconocido), M<sub>2</sub> (estado sanitario y medidas de control frente a BOC conocidos; M<sub>2-</sub> (la totalidad del rebaño es negativa a las pruebas oficiales pero no se ha alcanzado aún la clasificación M<sub>3</sub>/M<sub>4</sub>); M<sub>2+</sub> (al menos un animal no ha sido negativo a las pruebas oficiales o no ha sido evaluado), M<sub>3</sub> (indemnes según el RD2121/1993), M<sub>4</sub> (oficialmente libres RD2121/1993), MS (M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> con calificación suspendida según el RD1716/2000) y MR (M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> con calificación retirada según el RD1716/2000). Además el Plan Nacional de Erradicación de la BOC ofrece un resumen de la evolución de la enfermedad en la cabaña ganadera española a través de una serie

de indicadores epidemiológicos: i) prevalencia de rebaño (Figura XII.A) y ii) incidencia en rebaños e individuos (Figura XII.B).

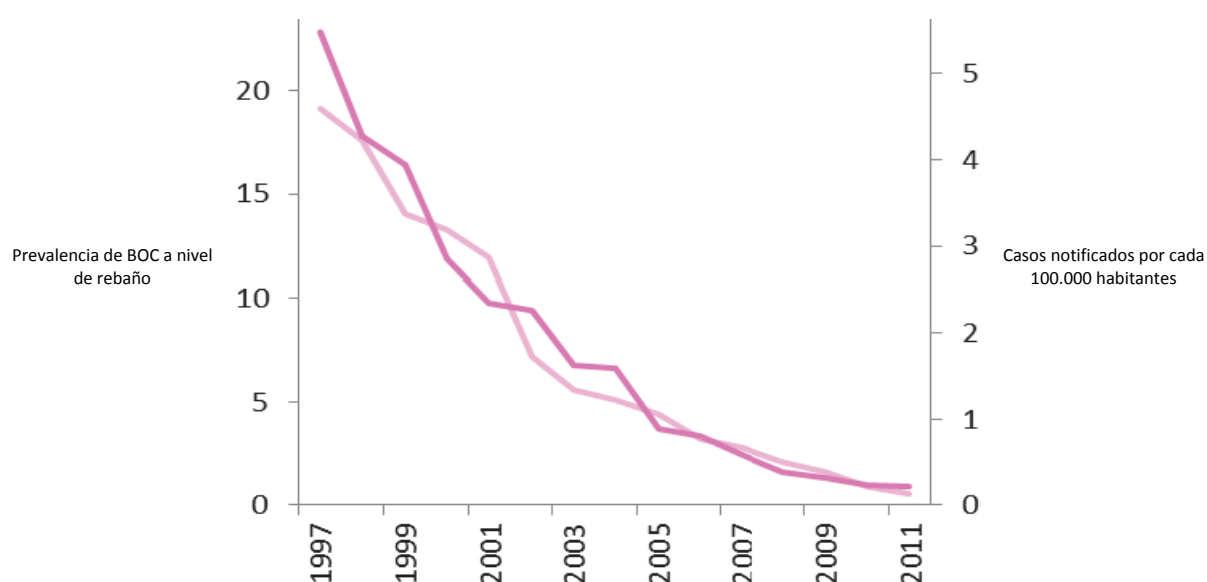


**Figura XII.** Evolución de los indicadores epidemiológicos indicados en el Plan Nacional de Erradicación de la Brucelosis Ovina y Caprina año 2012. Los datos del año 2011 han sido extraídos del Informe Final Técnico-Financiero Programa Nacional de la brucelosis ovina y caprina año 2011: XII. A) Seroprevalencia de rebaño (años 1993-2011), XII. B) Incidencia en animales (1993-2011) (Fuentes: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad) (Ministerio de Agricultura 2013).

Como se puede observar en la Figura XIII el número de casos de brucelosis en personas también ha seguido esta tendencia descendente, reflejo del impacto del control de esta enfermedad en los animales sobre la salud pública.

Actualmente la BOC es un problema controlado en España llegando incluso a niveles de erradicación en determinadas comarcas ganaderas (p.e. Islas Canarias). Ha sido el esfuerzo económico, de infraestructuras y personal que se ha invertido en la lucha contra esta enfermedad por parte de todos los actores implicados lo que ha conducido a la situación actual, de manera similar a lo observado años atrás en la brucelosis bovina. Y al igual que pasó en la lucha contra la enfermedad causada por *B. abortus*, los niveles de enfermedad en nuestro país se han reducido hasta unos niveles que han permitido la modificación de las medidas adoptadas a lo largo de la última década con el fin de alcanzar la erradicación de la BOC. La experiencia derivada de otros lugares que han conseguido controlar la enfermedad hasta niveles

de erradicación ha demostrado que la estrategia del diagnóstico serológico unido al sacrificio de los animales reactivos es imprescindible como herramienta de vigilancia para detectar y controlar la (re-)aparición de nuevos casos. Actualmente la aproximación diagnóstica que se aplica en España consiste en usar la técnica RB como herramienta de cribado y confirmar posteriormente todos los casos positivos mediante la técnica de FC (excepto en rebaños infectados donde se aplican en paralelo) (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2013). A pesar de la utilidad de esta aproximación aplicada sobre animales vacunados, se estima que esta estrategia entre un 6 y un 10% de los animales infectados podrían no ser detectados, poniendo de manifiesto ciertas limitaciones diagnósticas en los programas de lucha contra la BOC basados en el uso de RB y FC en serie (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000).



**Figura XIII.** Evolución de la prevalencia a nivel de rebaño de brucelosis en los pequeños rumiantes (línea rosa claro) y casos notificados de brucelosis humana (expresado como Tasas notificadas a nivel estatal por cada 100000 habitantes, línea rosa oscuro) en el periodo comprendido entre 1997 y 2011 en España (Fuentes: i) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad: datos de sanidad animal y ii) Instituto de Salud Carlos III (<http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/761/867>)

La situación es algo más complicada cuando se abordan estrategias como el cese de la inmunización con Rev. 1. Algunos autores recomiendan abandonar esta

estrategia únicamente cuando la prevalencia sea cero durante, al menos, una generación entera (8-12 años) y siempre que no exista riesgo de infección desde áreas próximas (FAO, 2009). En términos absolutos estas afirmaciones sobre el control de la BOC pueden resultar sencillas de aplicar; el problema surge cuando se evalúa el impacto que tienen sobre la producción ovina y caprina: el mantenimiento de la vacunación con Rev. 1 puede conllevar por ejemplo i) una limitación en las exportaciones internacionales (y nacionales, ya que sólo está permitido el comercio de animales vivos entre explotaciones de igual o mejor calificación), y ii) los costes asociados que lleva la inmunización anual de toda la cabaña de ovino y caprino de 3-6 meses. En el otro lado de la balanza se sitúan todas las razones que desaconsejan abandonar la inmunización contra BOC (riesgo de brotes de enfermedad, reaparición de casos en rebaños libres, etc.). El panorama se complica aún más cuando esta decisión se plantea en un escenario epidemiológico tan complejo como el de nuestro país. Si bien existen autores que consideran que la prevalencia media de una región como un parámetro extrapolable a todas sus comarcas puede constituir una aproximación demasiado grosera (Blasco, 2010c), se debe considerar que el abordaje de este problema mediante la regionalización del programa de vacunación puede resultar difícil de abordar desde un punto de vista técnico y económico. Adicionalmente, se debe considerar que la utilización de indicadores más precisos que la prevalencia media a nivel local resulta muy difícil a la hora de implementar medidas de carácter regional/nacional.

**Tabla XI.** Resumen de medidas a aplicar del Programa de Erradicación de la brucelosis ovina y caprina (*B. melitensis*) para el año 2014 comunes a todas las comunidades autónomas (Fuente: Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente)

| Medida   | Ámbito de aplicación  | Estrategia  |
|--|---|---|
| Sacrificio de reactores                              | Animales seropositivos a las pruebas oficiales (habitualmente RB y FC)  | Sacrificio <i>in situ</i> en los 15 días posteriores al resultado, cadáveres a planta autorizada<br>Si >20% infectados: sacrificio en matadero autorizado (monitoreización oficial)<br>Si hembra reproductora infectada: sacrificio crías de último parto (si es posible)   |
| Toma de muestras                                     | Rebaños M3/M4: calificación suspendida/retrada<br>Rebaños no calificados (sobre todo si 1 o más casos +)<br>Si se han dado casos de brucelosis humana                   | Manual de Toma de Muestras 2010   |
| Control de acceso y calificación de pastos comunales | Rebaños que acuden a un pasto de aprovechamiento común (considerado como unidad epidemiológica)   | A todos los rebaños que acuden a un pasto se les asigna la mínima calificación que presente alguno de los rebaños presentes. Prohibición del acceso a rebaños con menor calificación que la asignada al pasto   |
| Investigaciones epidemiológicas                      | Explotaciones con calificación suspendida o retrada (y todas las explotaciones epidemiológicamente relacionadas)  | ↑ encuestas epidemiológicas establecidas (fuente de infección?) en explotaciones estudiadas y aquellas epidemiológicamente relacionadas siguiendo el 'Manual para la realización de encuestas epidemiológicas reducidas 2012' (o 2006 en el segunda caso) (Base de datos informática BRUTUB. Cepas aisladas remitidas a Laboratorio Nacional de Referencia de Brucelosis) |
| Vacunación   | Rebaños M3 y M4 con sospecha de falsos reactores  | Manual para la identificación y clarificación de Falsos Reactores Serológicos Positivos   |
| Pruebas previas al movimiento                        | Animales de reposición (contemplada en adultos)<br>Si trashumancia o movimientos comerciales (no si destino matadero o cebo para después ir a matadero)                 | Rev. 1 vía conjuntiva a dosis completas > 5 años (en adultos: dosis reducidas)<br>En los 30 días antes de movimiento<br>En 100% de animales que se trasladan. Excepciones   |
| Vigilancia en fauna silvestre                        | Comunidades Autónomas con reservorio silvestre o amplia extensión geográfica o implicación demostrada de silvestres en epidemiología de la enfermedad (resio: optativa) | Sistema de recogida de muestras de animales silvestres  |

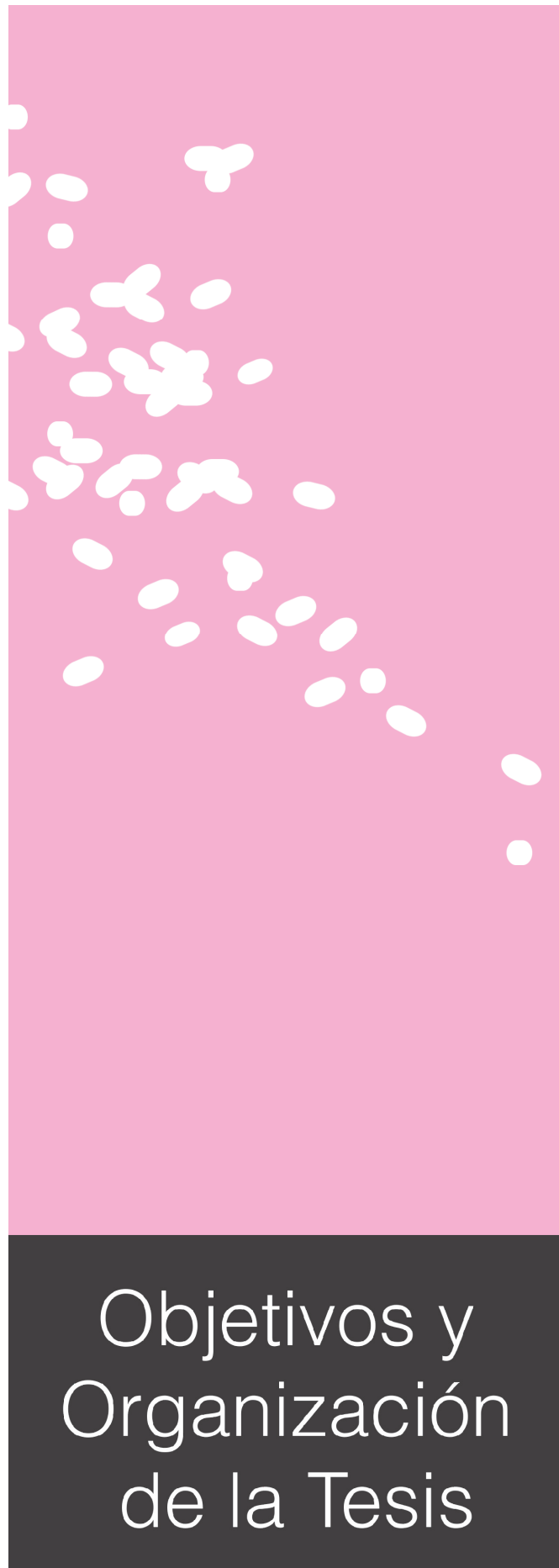
**Tabla XII.** Principales medidas del Programa de Erradicación de la brucelosis ovina y caprina (*B. melitensis*) para el año 2014 en función de la situación epidemiológica de las diferentes comunidades autónomas (Fuente: Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

| Situación epidemiológica respecto a BOC en 2013 | Comunidades Autónomas   | Plan de Erradicación de BOC ( <i>B. melitensis</i> )  |   |  |
|---|---|---|---|--|
|   |   | Objetivo  | Estrategia  | Medidas  |
| Oficialmente Libres (OL)                        | Islas Canarias, Islas Baleares, Asturias, Cantabria, País Vasco, Castilla y León, Galicia | Mantener estatuto de OL   | Programa de vigilancia epidemiológica   | Vigilancia epidemiológica de acuerdo a la Directiva 91/68/CEE y modificaciones   |
| Prevalencia cero                                | Navarra y La Rioja  | Optar a OL en 2014<br><br>Mantener OL si alcanzado en 2013 (prevalencia de rebaño cero, explotaciones $\geq 99,8\%$ M4)   | 1. Diagnóstico y sacrificio de reactores<br>2. Vaciado sanitario si infección o sospecha no descartable<br>Si infección confirmada, prueba adicional en explotaciones cercanas o epidemiológicamente relacionadas | 1. Prohibición vacunación (excepto si riesgo epidemiológico)<br>2. Monitorización:<br>-M4: $\geq 1$ muestreo/año. Si reactores: sacrificio de reactores y suspensión de calificación hasta confirmación (en tal caso, vacio sanitario)<br>-M2: $\geq 1$ muestreo/6 -8 meses hasta su calificación<br>-Si calificación suspendida: siguiente prueba antes de 30 días tras aislamiento/sacrificio y cada 3 meses hasta recuperar calificación.<br>Si prevalencia cero en 100% rebaños ( $y > 99\%$ M4): $\downarrow$ frecuencia de chequeos según Directiva 91/68/CEE (en 2014, 1/3 de rebaños muestreados aleatoriamente de tal modo que cada 3 años se muestreen todos los rebaños).   |
| prevalencia $< 1\%$                             | Aragón, Castilla la Mancha, Cataluña, Extremadura, Madrid, Murcia y Valencia.             | Alcanzar niveles de erradicación en 2016 y calificación de explotaciones como M4 (prevalencia rebaño=0 en 2016, $\downarrow 40\%$ rebaños positivos respecto al año anterior) | 1. Diagnóstico y sacrificio de reactores. Vaciado sanitario, vacunación sólo en determinadas zonas. Si infección confirmada, prueba adicional en explotaciones cercanas o epidemiológicamente relacionadas        | 1. En comarcas veterinarias con M3/M4: vacunación prohibida (excepciones: si $< 5$ años vacunando o riesgo epidemiológico). Aparición reactores en M3/M4: sacrificio de reactores y suspensión de calificación hasta confirmación (en tal caso, vacio sanitario)<br>2. Resto comarcas veterinarias: vacunación de reposición (3-6 meses de edad) (excepto M4 o M3 en vías M4). En explotaciones sin/suspendida/calificada calificación: vaciado sanitario si 3 + consecutivos o $> 20\%$ seroprevalencia intra-rebaño a 1 sola prueba oficial.<br>3. Monitorización:<br>- M3/M4: $\geq 1$ muestreo/año (en 100% animales susceptibles por edad si prev. rebaño $> 1\%$ en 2013);<br>-M2 +: cada 3 meses hasta M2-. Después $\geq 1$ muestreo/6 -8 meses hasta calificación<br>-Si calificación suspendida/retrada: siguiente prueba 30 días después de aislamiento/sacrificio y cada 3 meses hasta recuperar calificación<br>-Si infección confirmada: RB o FC (u otra prueba oficial) en paralelo<br>-Si se alcanza OL en 2013: vigilancia según en Directiva 91/68/CEE y |



| Situación epidemiológica respecto a BOC en 2013 | Comunidades Autónomas | Plan de Erradicación de BOC ( <i>B. melitensis</i> )                                       |  |   |
|---|-----------------------|--|--|---|
|   |                       | Objetivo   | Estrategia   | Medidas   |
|   |                       |  | modificaciones   |   |
| Prevalencia >1%                                 | Andalucía             | ↓ prevalencia de rebaño hasta <0.5% en 2014<br><br>(140% la prevalencia de rebaño de 2012) | Vacunación sistemática de reposición. Diagnóstico y sacrificio de positivos. Calificación explotaciones. Vaciado sanitario en zonas infectadas | 1. Chequeos con misma frecuencia q en CCAA con <1%. M3/M4: mismas medidas (3 y 5) que si prev. < 1% pero siempre se muestrea 100% animales susceptibles por edad en M3 y M4 salvo si prev. rebaño <1% y sin rebaños + en 2012 y 2013. Si infección, RBT y CFT en paralelo   |
|   |                       |  |  | 2. Unidad epidemiológica (comarca o UVL): vacunación sistemática de reposición (3-6 meses de edad)  |
|   |                       |  |  | 3. Excepciones no vacunación en explot. M4 y M3 en vías de M4 donde prev. rebaño<1% en 2013 y no casos confirmados: necesario justificación oficial).   |
|   |                       |  |  | 4. Vaciado sanitario si 3 + consecutivos o >20% prev. seroprevalencia intra-rebaño a 1 sola prueba oficial en explot. exentas de vacunación/ y en explotaciones sin o retirada calificación.  |
|   |                       |  |  | 5. Vacunación masiva si (obligatorio: previa comunicación a Rasve):<br>a. ↑ prev. brucelosis en humanos<br>b. Rebaños aislados con alto riesgo epidemiológico para otros rebaños<br>c. Situaciones graves de difusión enfermedad o para salud pública                       |
|   |                       |  |  | 6. Zonas de Especial Incidencia (ZEI): comarcas o UVL con prev. rebaño >3%. Opciones vacunación:vacunación de animales de reposición sin considerar calificación (pueden existir excepciones justificadas en M4 y M3 para M4). Vaciado sanitario si situaciones de punto 4. |







La importancia de *B. melitensis* en sanidad animal y salud pública justifican los enormes esfuerzos económicos y humanos que se han empleado en el control de esta zoonosis en todo el mundo. El hospedador preferencial de este patógeno son los pequeños rumiantes, protagonistas principales del presente trabajo, aunque la enorme capacidad de adaptación de *B. melitensis* a otras especies animales (vacas, búfalos, camélidos, etc.) le ha permitido incrementar su rango de hospedadores y, con ello, sus vías de transmisión al hombre así como su impacto en la producción animal. Los programas de lucha contra *B. melitensis* se centran en el control/erradicación de la enfermedad en el ganado ovino y caprino, considerados la principal fuente de infección para otros animales y el hombre. Se considera que la vacunación y/o el diagnóstico y sacrificio de animales positivos son las estrategias más adecuadas para el control de la brucelosis ovina y caprina (junto con la puesta en práctica de estrictas medidas de bioseguridad). El éxito de la implementación de la Rev. 1 en la lucha contra BOC en todo el mundo y la ausencia de cepas vacunales seguras y eficaces alternativas la han convertido en la única vacuna actualmente disponible para la inmunización de los pequeños rumiantes. Sin embargo, esta vacuna no está exenta de inconvenientes (como su capacidad para inducir abortos y la interferencia diagnóstica que provocan los anticuerpos vacunales) que limitan su aplicación en el campo (vacunación restringida a animales prepúberes, no gestantes, de 3-6 meses de edad). El diagnóstico de la BOC se realiza mediante técnicas serológicas que permiten el análisis a gran escala, situación propia de las campañas

de saneamiento de los programas de lucha contra BOC. Debido a ciertas limitaciones en la especificidad de las técnicas serológicas tradicionalmente empleadas, la infección por *B. melitensis* requiere una confirmación laboratorial mediante cultivo (actualmente considerada la técnica de referencia). En este contexto, el desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico y control de *B. melitensis* en rumiantes domésticos que permitan superar las restricciones de las herramientas actualmente empleadas permitiría optimizar las estrategias en la lucha, que se alarga ya más de 100 años, contra este importante agente zoonótico.

Por todo ello, el principal objetivo de la presente tesis doctoral es la evaluación de nuevas aproximaciones metodológicas en la detección y caracterización de *B. melitensis* así como de herramientas alternativas para la inmunización frente a este patógeno en pequeños rumiantes. Para su consecución, este trabajo persigue los siguientes subobjetivos:

1. Evaluación de la utilidad de técnicas de detección y caracterización molecular en la lucha contra *B. melitensis* (y otras especies de *Brucella*) en rumiantes domésticos:
  - Desarrollo y puesta a punto de una nueva técnica de amplificación isotérmica LAMP para la detección directa de *Brucella* spp. y evaluación de la misma mediante un estudio comparativo con otras herramientas de detección directa (bacteriología y PCR en tiempo real) en un panel de muestras clínicas.
  - Aplicación de la técnica MLVA en el control de *B. melitensis* en diferentes escenarios epidemiológicos:
    - Evaluación de la diversidad genética de cepas de *B. melitensis* y *Brucella* spp. circulantes en los rumiantes domésticos en Egipto.
    - Control de un brote de *B. melitensis* en explotaciones de ganado bovino lechero.
2. Diseño de nuevas estrategias para la prevención y control de *B. melitensis* en ganado ovino

- Evaluación de la utilidad de una nueva vía de vacunación, la vía intradérmica, para el control de la brucelosis de los pequeños rumiantes y comparación de ésta con las vías clásicas de inmunización con Rev. 1 atendiendo a:
  - La respuesta serológica inducida
  - La respuesta de IFN- $\gamma$  inducida
  - La protección inducida frente a un desafío con *B. melitensis* 53H38 en el momento de máxima susceptibilidad del hospedador (ovejas primíparas en el último tercio de la gestación)
- Evaluación de la seguridad y capacidad inmunógena de *B. melitensis* B115 como una potencial alternativa para la vacunación contra BOC.

La consecución de los objetivos aquí expuestos se ha abordado mediante los siguientes trabajos de investigación:

Capítulo 1: Detección y Caracterización molecular de *B. melitensis* y otras especies zoonóticas de *Brucella*

Development and evaluation of an IS711-based loop mediated isothermal amplification method (LAMP) for detection of *Brucella* spp. on clinical samples. **Pérez-Sancho M**, García-Seco T, Arrogante L, García N, Martínez I, Díez-Guerrier A, Perales A, Goyache J, Domínguez L, Álvarez J. Res Vet Sci. 2013 Oct;95(2):489-94. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.05.002.

Assessment of genetic diversity of zoonotic *Brucella* spp. recovered from livestock in Egypt using multiple locus VNTR analysis. Menshawy AM, **Pérez-Sancho M**, García-Seco T, Hosein HI, García N, Martínez I, Sayour AE, Goyache J, Azzam RA, Domínguez L, Álvarez J. Biomed Res Int. 2014;2014:353876. doi: 10.1155/2014/353876.

Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain. Álvarez J, Sáez JL, García N, Serrat C, **Pérez-Sancho M**, González S, Ortega

MJ, Gou J, Carbajo L, Garrido F, Goyache J, Domínguez L. Res Vet Sci. 2011 Apr;90(2):208-11. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.05.028.

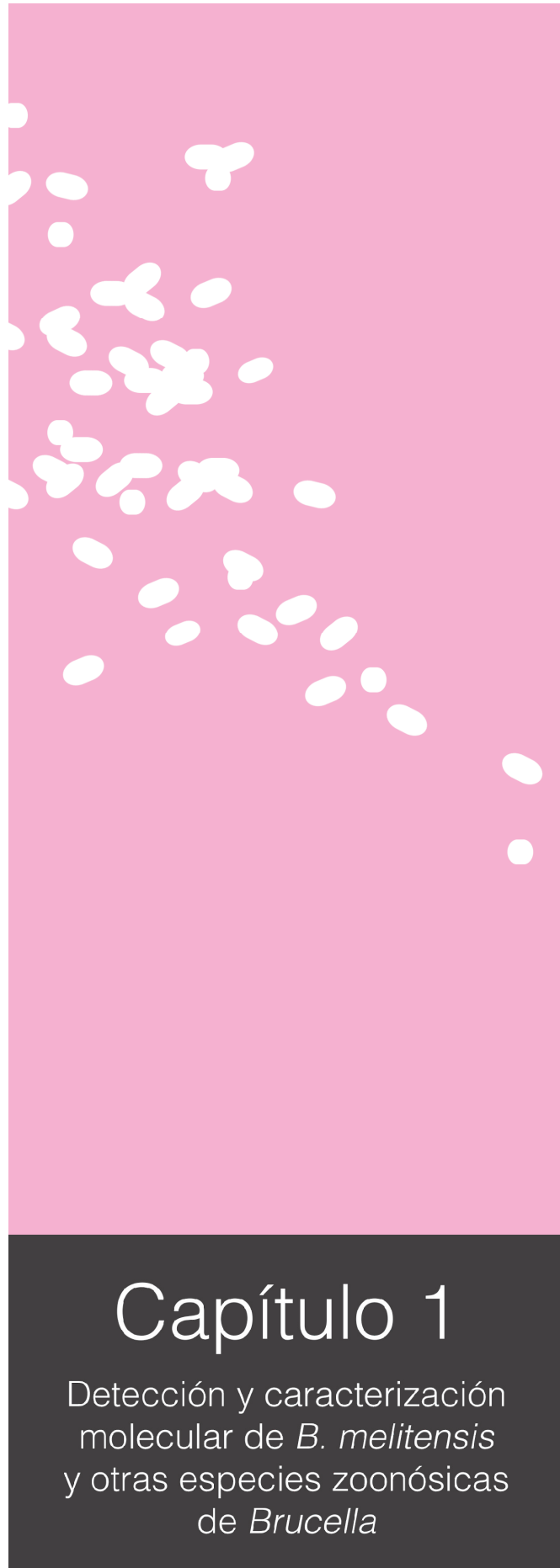
## Capítulo 2: Control y Erradicación de *B. melitensis*

Evaluation of the suitability of the intradermal route for Rev. 1 vaccination in ewes and comparison with classical routes. Trabajo de investigación desarrollado en el marco del Proyecto Nacional AGL2009-12674 del Ministerio de Ciencia e Innovación 'Aplicación de nuevos métodos para el diagnóstico y control de la brucelosis ovina, caprina y bovina por *Brucella melitensis* y *B. abortus*'.

Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. **Pérez-Sancho M**, Durán-Ferrer M, García-Seco T, Macías P, García N, Martínez I, Ruiz E, Legaz E, Diez-Guerrier A, González S, Domínguez L, Álvarez J. Vet. Immunol. Immunopat. 2014. Jul 15;160(1-2):123-8. doi:10.1016/j.vetimm.2014.03.014.

Evaluation of the immunogenicity and safety of *Brucella melitensis* B115 vaccination in pregnant sheep. **Pérez-Sancho M**, Adone R, García-Seco T, Tarantino M, Diez-Guerrier A, Drumo R, Francia M, Domínguez L, Pasquali P, Alvarez J. Vaccine. 2014 Apr 1;32(16):1877-81. doi:10.1016/j.vaccine.2014.01.070.





# Capítulo 1

Detección y caracterización  
molecular de *B. melitensis*  
y otras especies zoonóticas  
de *Brucella*



## RESUMEN

Las restricciones prácticas del cultivo unidas a la necesidad de confirmar la infección por *B. melitensis* han provocado que las técnicas moleculares hayan ganado interés en los últimos años, no sólo como una alternativa para la detección del agente causal de BOC, sino también como una herramienta de gran valor en estudios epidemiológicos (por ejemplo, en la determinación del origen de un brote de enfermedad). Este primer capítulo incluye tres trabajos que ponen de manifiesto la utilidad de las herramientas moleculares en el contexto de distintos programas de lucha contra la brucelosis animal.

Las características de la técnica de PCR (alta especificidad y sensibilidad, posible aplicación a gran escala, rapidez en la obtención de resultados, etc.) la han convertido en la técnica de detección molecular más ampliamente utilizada en el diagnóstico de *Brucella* spp. Sin embargo la aplicación de la PCR está condicionada por la necesidad de equipamiento específico (termocicladores, fuentes de electroforesis, etc.) que, a menudo, no está disponible en lugares donde un diagnóstico rápido y fiable es muy necesario y están fuera del alcance de laboratorios de regiones con recursos económicos limitados (donde la brucelosis suele ser un problema endémico). En la última década, la técnica LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) ha emergido como una herramienta diagnóstica de interés

ya que tan solo requiere un dispositivo capaz de mantener una temperatura constante (alrededor de 63°C), la lectura del resultado de la prueba se puede realizar a simple vista mediante la adición de ciertos reactivos y, además, ofrece un rendimiento similar al de la PCR en términos de sensibilidad y especificidad. La aplicación de la técnica LAMP en el diagnóstico de *Brucella* spp. ha ofrecido resultados prometedores, si bien los estudios realizados hasta la fecha adolecen de una limitada variabilidad y/o número de muestras clínicas empleadas para la validación de las diferentes técnicas diseñadas. En este contexto, y ante la necesidad de disponer de técnicas de fácil aplicación confirmatorias de la infección por *Brucella melitensis* y otras especies zoonóticas de *Brucella*, se llevó a cabo un estudio para el desarrollo de una técnica LAMP basada en una diana genética de copia múltiple (IS711) y su validación sobre un amplio panel de muestras clínicas de diferente naturaleza recogidas de ovejas, vacas y cerdos (n=88) mediante un estudio comparativo con los resultados obtenidos por bacteriología y PCR en tiempo real (RT-PCR). El presente trabajo ha evidenciado las ventajas de combinar más de una técnica diagnóstica directa para maximizar las posibilidades de detección de *Brucella* spp. en muestras clínicas. Además se ha puesto de manifiesto la utilidad de esta nueva técnica LAMP-IS711 como técnica complementaria del cultivo, destacando la capacidad de detección de *Brucella* spp. en muestras clínicas procedentes de ganado ovino y, en menor extensión, en ganado bovino y porcino, especialmente en especímenes procedentes de hembras que han sufrido un fallo reproductivo por *Brucella* spp. y los fetos resultantes del mismo. Por último, se ha evidenciado las ventajas de analizar muestras clínicas de diferente naturaleza para maximizar las posibilidades de detección de este agente patógeno.

La aplicación de herramientas de caracterización molecular permite obtener información sobre las especies de *Brucella* circulantes en la cabaña ganadera (indispensable para la adecuación de las medidas de lucha contra la brucelosis animal) y su diversidad genética, permitiendo evaluar su posible relación epidemiológica con aislados de otras regiones y con cepas de origen humano. El presente capítulo incluye dos ejemplos de la utilidad de la técnica de caracterización MLVA (*Multilocus Variable Number Tandem-Repeat Analysis*) en la lucha contra la brucelosis animal. El primer ejemplo es un estudio llevado a cabo colaboración con la Universidad de Beni-suef (Beni-suef, Egipto) y el *Animal Health Research Institute* (Giza, Egipto) para evaluar la diversidad genética de 17 cepas de especies del

género *Brucella* aislados de distintas especies hospedadoras en varias regiones egipcias, entre ellas Assiut, Menofia, Beni-Suef y Sharkia. Los aislados fueron analizados mediante pruebas bioquímicas cuyos resultados fueron confirmados mediante PCR. Posteriormente fueron caracterizados molecularmente mediante MLVA. *B. melitensis* biovar 3 del grupo 'Mediterráneo Oeste' fue el biotipo más frecuente en el presente estudio, aunque la heterogeneidad genética observada fue considerable ( $h=0.801$ ), confirmando así el gran poder de discriminación genética que posee la técnica MLVA incluso cuando se caracterizan cepas epidemiológicamente relacionadas. Cuatro de los aislados recuperados de muestras de ganado bovino fueron identificados como *B. suis* ( $n=2$ ) y *B. abortus* ( $n=2$ ). Si bien la presencia de *B. abortus* en el país ha sido puesta de manifiesto anteriormente de forma ocasional, ésta ha sido la primera descripción de la presencia de *B. suis* biotipo 1 en ganado bovino en Egipto. A pesar del limitado número de aislados incluidos, el presente estudio ha revelado la compleja situación epidemiológica respecto a la brucelosis animal presente en Egipto (las tres especies zoonóticas más importantes del género *Brucella* se aislaron de rumiantes domésticos), poniendo de manifiesto la necesidad de realizar más estudios con el fin de evaluar la prevalencia de cada uno de estos patógenos en la cabaña ganadera del país, así como el papel epidemiológico de los rumiantes y cerdos domésticos en el ciclo biológico de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*.

En el segundo ejemplo, la técnica MLVA fue una herramienta eficaz en el esclarecimiento del origen de un brote de *B. melitensis* en ganado bovino (un problema emergente de difícil control debido al desconocimiento de la epidemiología de este patógeno en esta especie animal y la falta de vacunas de validez demostrada). El brote afectó a siete personas y más de 2.000 vacas procedentes de cuatro explotaciones (A:  $n > 550$  animales; B:  $n > 550$ ; C:  $n > 550$  y D:  $n=916$  animales) situadas en el noroeste de España y relacionadas epidemiológicamente. El estudio epidemiológico sobre el posible origen del brote reveló que una oveja de origen desconocido había convivido en la granja D durante un breve periodo de tiempo sin las medidas de bioseguridad apropiadas. Al mismo tiempo, una vaca abortó en la granja D y fue transportada a la granja C sin tomar ninguna medida de prevención ni investigación sobre el origen del aborto. Animales de las granjas A y B que habían convivido con esta vaca que abortó en la granja D fueron seropositivos cuando se les

analizó en su explotación de origen, poniendo de manifiesto que el animal abortado en la granja D podría haber sido el primer caso en el brote de *B. melitensis*. La técnica MLVA fue aplicada para investigar el posible origen del brote; se estudiaron aislados de *B. melitensis* de vacas (cinco animales de la granja A, tres de la granja B y uno de la C), humanos que sufrieron la enfermedad (n=2) y ovejas procedentes de una explotación cercana a la granja D. El panel 2 del MLVA puso de manifiesto la existencia de 4 perfiles principalmente diferenciados por el polimorfismo del *locus* 16 y especialmente el *locus* 9 (previamente identificados como los *loci* más hipervariables del panel del MLVA). Las explicaciones más razonables para los resultados observados eran i) la existencia de más de una cepa de *B. melitensis* que causara el brote de manera simultánea o ii) una mutación en el *locus* 9 de la cepa causante del brote que diera lugar a los perfiles de MLVA observados. La mutación de un único *locus* en una cepa de *Brucella* spp. tras múltiples pases *in vivo* e *in vitro* ha sido observada previamente, haciendo ganar peso a la segunda hipótesis y avalando la hipótesis de que el origen del brote fue la introducción de una oveja sin las medidas de bioseguridad adecuadas.

## ESTUDIO 1

Author's personal copy

Research in Veterinary Science 95 (2013) 489–494



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rvsc](http://www.elsevier.com/locate/rvsc)

## Development and evaluation of an IS711-based loop mediated isothermal amplification method (LAMP) for detection of *Brucella* spp. on clinical samples

M. Pérez-Sancho<sup>a,b</sup>, T. García-Seco<sup>a</sup>, L. Arrogante<sup>c</sup>, N. García<sup>a</sup>, I. Martínez<sup>a</sup>, A. Diez-Guerrier<sup>b</sup>, A. Perales<sup>c</sup>, J. Goyache<sup>a,b</sup>, L. Domínguez<sup>a,b</sup>, J. Álvarez<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup>Laboratorio Central de Sanidad Animal, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Camino del Jau s/n, 18320 Santa Fe, Granada, Spain

<sup>d</sup>Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Ctra. Colmenar Viejo, km. 9.100, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 5 November 2012  
Accepted 4 May 2013

**Keywords:**  
Bacteriology  
*Brucella*  
Loop mediated isothermal amplification (LAMP)  
PCR

### ABSTRACT

DNA-based methods have emerged as an additional tool for *Brucella* infection-confirmation at a herd level. However, their implementation may require the use of specialized equipment. In this context the recently developed loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique may constitute an additional and cost-effective tool for rapid and specific DNA detection, especially in low income areas. In the present study the usefulness of a newly developed LAMP assay aiming at the multicopy-IS711 sequence was assessed on a variety of clinical samples ( $n = 81$  from abortions and ewes; cattle,  $n = 3$ ; swine,  $n = 4$ ) that were analyzed in parallel using real-time PCR and bacteriology. Although overall sensitivities obtained with the three methods were comparable ( $p > 0.05$ ), our results highlighted the complementarity between bacteriology and molecular-based methods for increased sensitivity. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed with all techniques depending on the nature of the sample. Our results demonstrate the potential of the IS711-LAMP technique for direct *Brucella* detection.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Brucellosis is an important zoonosis in European Mediterranean countries, north and east Africa, the Middle East, South and Central Asia and Central and South America (World Health Organisation et al., 2006). Human brucellosis is directly linked to the presence of infected animal reservoirs (Godfroid et al., 2005; Seleem et al., 2010). *Brucella melitensis*, causative agent of small ruminant brucellosis, is the most frequent species involved in human brucellosis (Godfroid et al., 2005) although *Brucella abortus* and certain *Brucella suis* biovars have been also recognized as major zoonotic agents. Moreover, animal brucellosis causes severe economic losses and restrictions on international animal movement and trade (Crespo, 1994). Programs for eradication/control of animal brucellosis have been implemented worldwide. In most developed countries, these programs are usually based on the performance of serological diagnostic followed by the slaughter of reactors (test and slaughter strategy). However, serologic tests may lack specific-

ity under certain field conditions due to cross reactions with other Gram negative bacteria (Corbel, 1985).

Definitive diagnosis usually requires laboratory confirmation by isolation of the causative agent (considered the 'gold-standard' technique) from clinical samples (Alton et al., 1988). Still, bacteriology has several disadvantages (need of highly skilled personnel, level 3 biosecurity facilities, limited sensitivity when low bacterial loads are present and availability of results after several days) (Alton et al., 1988; Al Dahouk et al., 2003). Methods based on direct *Brucella*-DNA detection may overcome these drawbacks. Previous studies have confirmed the usefulness of direct-PCR techniques for *Brucella* detection (Fekete et al., 1992; Leal-Klevezas et al., 1995; Cetinkaya et al., 1999; Cortez et al., 2001; Hamdy and Amin, 2002; Leyla et al., 2003; İlhan et al., 2008; Marianelli et al., 2008) but may require the use of specialized equipment. This could be especially problematic in developing countries where access to well-equipped laboratories may be limited and brucellosis remains endemic.

The recently described DNA detection technique based on the isothermal amplification of specific sequences, the loop mediated isothermal amplification (LAMP) technique (Notomi et al., 2000) may constitute a feasible and cost-effective alternative for molecular diagnosis. This technique is based on a set of specific primers (a minimum of four which recognize six different regions of

\* Corresponding author at: Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Ctra. de Colmenar Viejo Km. 9.100, 28034 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 336 8330; fax: +34 91 394 3795.

E-mail addresses: [jalvarez@visavet.ucm.es](mailto:jalvarez@visavet.ucm.es), [jalvarezvet@gmail.com](mailto:jalvarezvet@gmail.com) (J. Álvarez).

the genome) which produce a stem-loop DNA with several inverted repeats of the target and cauliflower-like structures with multiple loops (Notomi et al., 2000). This technique has drawn an increased interest in the last decade, leading to the publication of more than five hundred manuscripts dealing with LAMP application for different purposes. LAMP method has several advantages: high specificity and easy of performance and interpretation (once standardized can be carried out in a water bath and results can be visualized by the naked eye upon the addition of different reagents (Notomi et al., 2000; Mori et al., 2001; Nagamine et al., 2002). To our knowledge, only four reports on the application of this method for the detection of *Brucella* spp. have been published (Ohtsuki et al., 2008; Lin et al., 2011; Pan et al., 2011; Song et al., 2012). These studies obtained promising results, but a limited variety of clinical samples was analyzed.

In this context, a study was conducted aiming at: (i) development of a novel IS711-based LAMP assay for *Brucella* spp. detection and (ii) evaluation of its usefulness compared with traditional diagnostic methods (direct real-time PCR detection and bacteriology).

## 2. Materials and methods

### 2.1. LAMP design and optimization

Four primers were designed using LAMP primer designing software PrimerExplorer V4 (<http://primerexplor-er.jp/e/>) targeting the IS711 sequence from *B. suis* 1330 (AE014292.2 in Genbank) (Table 1). Optimization of the LAMP assay conditions was carried out using different concentrations of MgCl<sub>2</sub> (0.5–2 µM) and the effect of different amplification temperatures (60–65 °C) was also evaluated. The LAMP products were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel stained with SYBR Safe or directly observed under ultraviolet light after addition of 1/10 dilution of SYBR Safe (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). In order to accelerate the amplification, other two primers (loop primers) (Table 1) were included in the reaction mix (Nagamine et al., 2002). Optimal reaction mix was established as follows: 0.5 µl of F3 10 µM, 0.5 µl of B3 10 µM, 0.5 µl of FIP and BIP 100 µM (each), 0.5 µl of each Loop primer 50 µM, 3 µl of deoxynucleotide triphosphate (each 2.5 mM), 2.5 µl of Betaine 5 M (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2 µl of MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 16 units of *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs), 2.5 µl of Thermo Buffer 10× (New England Biolabs) and 4 µl of DNA. Although the reaction was successfully performed in the 60–65 °C range (data not shown), the optimized amplification protocol was set in an IQ™5 thermocycler (BioRad) at 60 °C for 60 min plus 80 °C for 2 min in a final volume of 25 µl.

For the real time monitoring of LAMP assay (analysis of melt curves), 1 µl of 1/10,000 dilution of SYBR Green I (Invitrogen) was added to each reaction mix. Amplification protocol was performed in thermocycler (IQ™5 thermocycler, BioRad, Berkeley, USA) as follows (adapted from previously published protocol)

**Table 1**  
Sequences of primers for IS711-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Brucella* spp. designed based of IS711 of *Brucella suis* 1330 (AE014292.2).

| Primer | Sequence   |
|--------|--|
| B3     | 5'-GCCGATCACTTAAGGGCC-3'                               |
| F3     | 5'-CAATGTTTCTCGCATCGCA-3'                              |
| FIP    | 5'-GGCTGTACAAGGAACGCCATCA-TTTT-ACGACGATAGCGTTTCAACT-3' |
| BIP    | 5'-TTGTGGGACACTGGAACGTGT-TTTT-TCATGCCGCCATCTCAAG-3'    |
| Loop F | 5'-GATTGAATGCTTTTAAACA-3'                              |
| Loop R | 5'-CTTGATCTGAGCCGTTG-3'                                |

(Peyrefitte et al., 2008): one cycle of 60 steps of 1 min at 60 °C with fluorescence reading at the end of each step, followed by a standard curve analysis by heating for 30 s at 95 °C and 30 s at 60 °C and then increasing the temperature to 95 °C with 0.5 °C/10 s ramping with continuous fluorescence monitoring before a final cooling step for 10 s at 40 °C.

DNA of the main zoonotic *Brucella* species (*B. suis*, *B. abortus* and *B. melitensis*) were used as a template to evaluate multi-species LAMP detection capacity. Detection limit of LAMP technique was determined using 10-fold dilutions of purified DNA from *B. suis* of known concentration. Specificity of the LAMP amplification was evaluated by digestion of the LAMP products with the specific restriction enzyme *RsaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) which targets the F1 region, for 16 h at 37 °C according to the manufacturer instructions. In addition, DNA from 12 non-*Brucella* species was subjected to LAMP amplification to test the specificity of the reaction (Table 2).

### 2.2. Comparative analysis of clinical samples

Forty-six clinical samples from 17 aborted fetuses [lung ( $n = 15$ ), liver ( $n = 16$ ) and spleen ( $n = 15$ )] and 26 samples [mammary node ( $n = 21$ ) and milk ( $n = 5$ )] from 21 experimentally infected and aborted ewes (in which *B. melitensis* infection had been confirmed by isolation of the bacteria from vaginal fluids and/or their fetus) were analyzed in parallel using the new LAMP technique and direct RT-PCR detection/bacteriology as reference methods. Nine milk samples from an additional group of challenged and aborted ewes, from which tissue samples were not available, were included in the study. Finally, a subset of samples from cattle (3 pools of spleen and mammary lymph node) and swine (4 vaginal swabs) were analyzed. All samples were stored at –40 °C until analysis. All husbandry practices and animal procedures were authorized by the scientific and animal experiments committee of Complutense University of Madrid and animal research committee from Madrid Region (10/549484.9/09).

### 2.3. Bacteriology

Isolation of *Brucella* spp. was performed as previously described (Alton et al., 1988; OIE, 2010). For tissue samples, approximately 2 g of sample were placed in 1.5 ml of sterile saline solution and homogenized during a minimum of 10 min. An aliquot of the homogenized was used for molecular analysis (see below) and another aliquot of the remaining sample was inoculated onto

**Table 2**  
Bacterial species tested with the IS711-LAMP technique.

| Species                           | Source         | LAMP result |
|-----------------------------------|----------------|-------------|
| <i>Staphylococcus</i> spp.        | EUURL–AR ECAS  | –           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | CCHG15915      | –           |
| Verotoxigenic <i>E. coli</i>      | Our laboratory | –           |
| <i>Salmonella thiphimurium</i>    | CECT4594       | –           |
| <i>E. coli</i>                    | CECT434        | –           |
| <i>Campylobacter coli</i>         | EUURL–AR ECAS  | –           |
| <i>Enterococcus faecium</i>       | EUURL–AR ECAS  | –           |
| <i>Pseudochrobacterium</i> spp.   | Our laboratory | –           |
| <i>Coxiella burnetii</i>          | Our laboratory | –           |
| <i>Francisella tularensis</i>     | Our laboratory | –           |
| <i>Ochrobactrum anthropi</i>      | Our laboratory | –           |
| <i>Yersinia ruckeri</i>           | Our laboratory | –           |
| <i>Brucella melitensis</i> H38    | Our laboratory | +           |
| <i>Brucella melitensis</i> Rev. 1 | CZ Veterinaria | +           |
| <i>Brucella abortus</i>           | Our laboratory | +           |
| <i>Brucella abortus</i> S19       | CZ Veterinaria | +           |
| <i>Brucella abortus</i> RB51      | CZ Veterinaria | +           |
| <i>Brucella suis</i> bv. 2        | Our laboratory | +           |



*Brucella*-selective medium (Farrell, 1974) and incubated at 37 °C for 14 days. Vaginal and milk swabs were directly cultured on Farrell medium. *Brucella*-like colonies were heat-inactivated after suspension in 200 µl of water, and DNA was collected from the supernatant after centrifugation. Identification of *Brucella* spp. at the genus and species level was performed according to previous reported (Casanas et al., 2001) and using the Bruceladder kit (Ingenua, Tres Cantos, Spain), respectively.

#### 2.4. Direct DNA detection

DNA extraction from 100 µl of each homogenized tissue sample and of milk samples was performed using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer instructions with slight modifications (an centrifugation step previously extraction protocol, 40 µl protease, 250 µl ATL buffer, 300 µl AL buffer, 300 µl absolute ethanol and an additional step at 70 °C for 10 min). Vaginal swabs were immersed into 1 ml of phosphate buffered solution (PBS), and 200 µl of this PBS was subjected to DNA extraction using QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen). DNA was frozen at –40 °C until analyzed by RT-PCR and LAMP techniques. Detection of *Brucella* spp. by IS711 RT-PCR was performed as previously reported (Hinic et al., 2008) with slight modifications. Briefly, reaction mix was established as follows: 10 µl of QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen), 0.5 µl of Primer forward (20 µM), 0.5 µl of Primer reverse (20 µM), 0.2 µl of probe (20 µM), 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 5 µl of DNA and sterile RNase-Free water up to 25 µl. Amplification protocol was performed in an IQ<sup>TM</sup>5 thermocycler (BioRad) as follows: one cycle of 15 min at 95 °C, 40 cycles with denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 20 s and final extension at 72 °C for 10 min, and the same 10-fold dilutions of purified DNA from *B. suis* used for the LAMP was used for evaluation of its sensitivity.

#### 2.5. Statistical analysis

All samples were analyzed by the three techniques and results obtained in the different samples were compared using contingency tables. Proportions of positive samples were compared using the Chi-square test and agreement between techniques was evaluated by the Kappa statistic. Statistical analysis of the data was carried out using software WIN PEPI 4.0 (Abramson, 2004) and SPSS (Version 19, IBM, New York, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Optimization of LAMP reaction and analytical sensitivity and specificity

Typical LAMP products forming a ladder-like pattern were observed on the agarose gel when DNA from *B. suis*, *B. melitensis* and *B. abortus* as well as the S19, RB51 and Rev. 1 vaccine strains were used as the template. LAMP products were also evident by the naked eye under UV light after the addition of SYBR SAFE (Invitrogen) directly in the reaction tube (data not shown). Moreover, no amplification was observed with non-*Brucella* DNA (Table 2). The *Rsa* I (New England Biolabs) restriction digestion of LAMP products yielded three fragments of approximately 113, 105 and 75 bp as expected (Fig. 1). Real time monitoring of LAMP amplification (melting curve) process evidenced a unique amplified product. The detection limit of the reaction was 99 fg/µl for *B. suis*.

#### 3.2. Results of the analysis of clinical samples

Proportion of positive samples detected by each of the three techniques (bacteriology, RT-PCR and LAMP) are shown in Table 3. The three tests detected at least one tissue from the same proportion (14/17, 82.4%) of fetuses; 12 of them were detected by all three techniques, while discordant results between RT-PCR and LAMP/culture were found in two fetuses (I and II). Lung was the tissue in which more positive samples were obtained in all techniques (13/15, 86.7%), although discordant results in the RT-PCR results of fetus I–II were observed (Table 4). Direct molecular techniques detected the same 12/15 spleen samples, two of which tested negative in the bacteriological analysis (Table 4). Regarding liver samples, LAMP detected the lower proportion of samples (8/16, 50%); both RT-PCR and culture detected two additional liver specimens (Table 4).

A lower proportion of positive mammary lymph nodes from adult animals tested positive at the three techniques (Table 3). Again, discordances in the results were observed, with bacteriology detecting two samples missed by the molecular techniques while LAMP and RT-PCR detected three and two culture-negative samples, respectively (Table 4).

Regarding milk samples, all specimens tested positive in at least one test, with the three techniques detecting the same proportion of samples (12/14, 85.7%) (Table 3) and three samples being detected by one single test (Table 4).

Bacteriological analysis performed on three pooled samples (including spleen and the lymph node from the same animal) yielded positive results for all of them. RT-PCR detected three cattle samples while only two of them were positive in LAMP analysis. Finally, the four vaginal swabs from swine were positive at both RT-PCR and LAMP techniques, while bacteriology detected only two of them.

Overall, agreement between the three techniques was moderate-good (with Kappa values ranging from 0.59 to 0.65). Although RT-PCR detected the highest proportion of positive samples, no significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed with those obtained after LAMP and bacteriological analysis.

### 4. Discussion

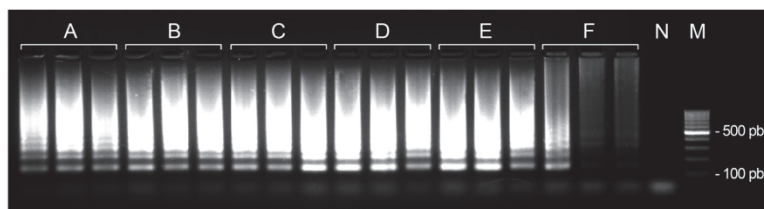
Isolation of *Brucella* spp. remains as the gold standard for diagnosis of animal brucellosis (Alton et al., 1988; OIE, 2010) and allows the performance of molecular characterization techniques on cultured strains. However, this method is time consuming, difficult for large-scale diagnosis and may lack sensitivity under certain circumstances. In addition handling *Brucella* is highly hazardous, requiring the availability of skilled technicians as well as level 3 biosafety facilities, what hampers its implementation in settings where limited resources are available. Molecular methods (PCR, Real Time PCR) may constitute an alternative for direct detection of the pathogen, but also require the use of specialized equipment.

The development of isothermal amplification techniques could be a feasible option for DNA *Brucella* detection as such it has been demonstrated in *Brucella* spp. (Ohtsuki et al., 2008; Lin et al., 2011; Pan et al., 2011; Song et al., 2012) and other pathogens. In spite of the successful results obtained in the four previously developed *Brucella*-LAMP techniques, a limited variety of samples were analyzed [two spleen and two livers from *B. abortus*-infected mice and *B. abortus* S19-contaminated milk (Ohtsuki et al., 2008); milk ( $n = 78$ ) and blood ( $n = 113$ ) from seropositive ruminants, seropositive human blood ( $n = 11$ ), milk from healthy ruminants ( $n = 40$ ) and blood from normal healthy individuals ( $n = 10$ ) (Lin et al., 2011); blood from sheep ( $n = 59$ ) and milk from cows ( $n = 110$ )

Author's personal copy

492

M. Pérez-Sancho et al. / Research in Veterinary Science 95 (2013) 489–494



**Fig. 1.** Detection limit of the LAMP assay for the detection of *Brucella suis* (98.7 ng/μl) as monitored by electrophoretic analysis of LAMP-products. Each 10fold-dilution has been performed in triplicate: lanes A (10<sup>-1</sup>), B (10<sup>-2</sup>), C (10<sup>-3</sup>), D (10<sup>-4</sup>), E (10<sup>-5</sup>) and F (10<sup>-6</sup>) (Lane N: non-template control; lane M: molecular ladder (100–1000 pb)).

**Table 3**

Number and proportion of clinical samples collected from aborted fetuses ( $n = 17$ ) and mammary lymph nodes ( $n = 21$ ) and milk samples ( $n = 14$ ) collected from experimentally infected and aborted ewes detected by LAMP, RT-PCR and bacteriology.

| Sample        | Tissue               | IS711 LAMP       | IS711 RT-PCR     | Bacteriology     |
|---------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|
| Aborted fetus | Overall <sup>a</sup> | 14/17<br>(82.4%) | 14/17<br>(82.4%) | 14/17<br>(82.4%) |
|               | Lung                 | 13/15<br>(86.7%) | 13/15<br>(86.7%) | 13/15<br>(86.7%) |
|               | Spleen               | 12/15<br>(80%)   | 12/15<br>(80%)   | 10/15<br>(66.7%) |
|               | Liver                | 8/16 (50%)       | 10/16<br>(62.5%) | 10/16<br>(62.5%) |
| Ewes          | Mammary lymph node   | 9/21<br>(42.9%)  | 9/21<br>(42.9%)  | 10/21<br>(47.6%) |
|               | Milk                 | 12/14<br>(85.7%) | 12/14<br>(85.7%) | 12/14<br>(85.7%) |

<sup>a</sup> A fetus was considered positive if at least one tissue sample yielded a positive result.

**Table 4**

Results of samples from aborted fetus and experimentally infected ewes in which discordances in the outcomes of the three techniques tested (LAMP, RT-PCR and bacteriology) were observed.

| Sample                   | No. | IS711 LAMP | IS711 RT-PCR | Bacteriology |
|--------------------------|-----|------------|--------------|--------------|
| Fetus Lung               | I   | –          | +            | –            |
|                          | II  | +          | –            | +            |
|                          | III | +          | +            | –            |
|                          | V   | +          | +            | –            |
| Liver                    | VI  | –          | +            | +            |
|                          | VII | –          | +            | +            |
|                          | 2   | –          | –            | +            |
| Ewes Mammary lymph nodes | 3   | –          | +            | +            |
|                          | 4   | –          | +            | +            |
|                          | 5   | +          | –            | +            |
|                          | 6   | +          | +            | –            |
|                          | 7   | +          | –            | –            |
|                          | 8   | +          | –            | –            |
|                          | 9   | –          | +            | –            |
|                          | A   | –          | –            | +            |
| Milk                     | B   | +          | –            | –            |
|                          | C   | –          | +            | –            |

(Song et al., 2012) and finally, contaminated milk and spleens and livers from *B. abortus* S19-infected mice (Pan et al., 2011)].

The multicopy IS711 target, present in all species of the *Brucella* in variable copy numbers (Ouahrani et al., 1993) has been widely used as the target of many PCR protocols (Bricker and Halling, 1994; Hinic et al., 2008; Bounaadja et al., 2009; Tomaso et al., 2010) increasing the sensitivity of the technique (Bounaadja et al., 2009). This target was used in the present study to develop a new LAMP in order to increase the sensitivity of previously

published LAMP techniques (based on single-copy genes) (Ohtsuki et al., 2008; Lin et al., 2011; Song et al., 2012). However, the analytic sensitivity of the IS711-LAMP was 10 times lower (100 fg/μl vs. 10 fg/μl) than those obtained with *Brucella* single-copy based LAMP techniques. Still, comparison of the results of a more sensitive LAMP with a nested-PCR with a lower detection limit (100 fg/μl, similar to the IS711-LAMP) did not yield significant differences in the number of positive samples detected by each technique (99% of concordant results) (Lin et al., 2011). Therefore, use of the IS711-LAMP on field samples may provide an adequate level of sensitivity for diagnostic purposes, as demonstrated in the present study on a wide variety of clinical samples. In addition, the specificity of the technique was successfully demonstrated by (i) the restriction pattern of the amplified product after *Rsa* I digestion (Fig. 1), (ii) analysis of melt curves and (iii) the lack of amplification when non-*Brucella* DNA was used as a template (Table 2).

Usefulness of the newly developed LAMP technique was assessed on clinical samples from animals/fetuses of known infectious status to evaluate its potential use under field conditions. Results obtained from samples of aborted fetus (highly contaminated) were comparable ( $p > 0.05$ , Table 3) regardless the direct detection technique (LAMP, RT-PCR and bacteriology) however it should be taken into account that the detection limit of RT-PCR observed in our study was lower than it was previously described (Hinic et al., 2008). Disagreement between LAMP and PCR-based results, observed mainly in mammary lymph node samples in this study, has been described before (Zhang et al., 2012; Salih et al., 2012). This could be due to a differential effect of inefficient bacterial DNA extraction, potential existence of inhibitors of PCR/polymerase activity in the clinical samples, presence of inhibitors of the reaction or large amounts of genomic host DNA on the mechanisms of LAMP/RT-PCR (Cogswell et al., 1996; Navarro et al., 2006).

The proportion of positive samples differed significantly ( $p < 0.05$ ) depending on the nature of the specimen (different tissues/milk/vaginal swab) regardless the diagnostic technique applied (Table 3) as previously reported (Tomaso et al., 2010). Regarding abortions, overall at least one tissue was positive in 14/17 of the analyzed fetuses; thus the use of pooled samples (combining at least lung, spleen and stomach content – not available in our study) may guarantee a maximum diagnostic capacity although a potential dilution-effect should be also considered. Infection of lung of bovine fetuses has been previously demonstrated (Perez et al., 1998); this could be associated with the aspiration of contaminated amniotic fluid (Lopez et al., 1984); this is in agreement with our findings, as this was the tissue yielding the higher proportion of positive results. In contrast, liver was the tissue in which a lower proportion of positive results were observed, as already reported in cattle (Xavier et al., 2009).

Although infection of ewes included in this study had been confirmed by *B. melitensis* isolation from vaginal fluids and/or their abortions, proportion of positive mammary lymph nodes was

significantly lower compared to what was found on milk samples (Table 3). This was previously observed by Xavier et al., 2009. Since the *Brucella* spp. load in infected animals may be influenced by the stage of infection (O'Leary et al., 2006), the high rate of bacterial isolation from milk samples could be associated with the moment of sample collection, close to abortion. Our results suggest the suitability of milk from aborted ewes for the detection of *Brucella* spp. by direct techniques as LAMP, although intermittent excretion should be considered in the interpretation of the results (Alton et al., 1988). Nevertheless, performance of the three tests was very similar regardless the nature of the sample (Table 3).

Only a limited number of samples from other animal species were available. LAMP missed one out of three positive lymph node/spleen samples from naturally infected cattle that were positive at both culture and RT-PCR, but performed similarly to RT-PCR (and better than bacteriology) on vaginal swabs from aborted swine. These results suggest again a high variability depending on the sample analyzed and point out an adequate sensitivity of the LAMP technique on heavily contaminated samples but a possible decreased performance on certain tissues from adult animals.

Although overall agreement between the three techniques was adequate, good there were a number of discordant outcomes between the tests resulting in specimens that would be detected by one single technique (Table 4). Therefore combination of several diagnostic techniques when possible may contribute to maximize diagnostic sensitivity as previously suggested (Ilhan et al., 2008; Marianelli et al., 2008). In fact, due to its high specificity and adequate sensitivity when performed on clinical samples from abortions, bacteriology should be still considered as the gold standard diagnostic test at a herd level.

## 5. Conclusions

Our findings demonstrate the usefulness of direct molecular techniques as ancillary tests to bacteriology as previously observed (Cortez et al., 2001) providing results in a timely manner. In particular, in this study IS711-LAMP technique has been demonstrated as a useful tool for etiological diagnosis of animal brucellosis in sheep and, to a lesser extent, in cattle and swine.

## Conflict of interest

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Acknowledgments

This study was supported by AGL-2009-12674 project (Ministerio de Ciencia e Innovación). Marta Pérez-Sancho is a recipient of a predoctoral grant from Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid (IV Plan regional de investigación científica e innovación tecnológica, 2005-2008) y Fondo Social Europeo. Authors also acknowledge the support of the EU FP7 ANTIGONE Project Number 278976.

## References

Abramson, J.H., 2004. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* 1, 6.

Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nockler, K., Neubauer, H., Frangoulidis, D., 2003. Laboratory-based diagnosis of brucellosis—a review of the literature. Part I: techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp.. *Clinical Laboratory* 49, 487–505.

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M., 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Inra Publications, Paris, France.

Bounaadja, L., Albert, D., Chenais, B., Henault, S., Zygmunt, M.S., Poliak, S., Garin-Bastuji, B., 2009. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative

study of IS711, bcs31 and per target genes. *Veterinary Microbiology* 137, 156–164.

Bricker, B.J., Halling, S.M., 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 2660–2666.

Casasas, M.C., Queipo-Ortuno, M.I., Rodríguez-Torres, A., Orduna, A., Colmenero, J.D., Morata, P., 2001. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20, 127–131.

Cetinkaya, B., Ongor, H., Muz, A., Ertas, H.B., Kalender, H., Erdogan, H.M., 1999. Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Veterinary Record* 144, 239–240.

Cogswell, F.B., Bantar, C.E., Hughes, T.G., Gu, Y., Philipp, M.T., 1996. Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 980–982.

Corbel, M.J., 1985. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Veterinary Bulletin* 55, 927.

Cortez, A., Scarcelli, E., Soares, R.M., Heinemann, M.B., Sakamoto, S.M., Genovez, M.E., Ferreira, F., Richtzenhain, L.J., 2001. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. *Australian Veterinary Journal* 79, 500–501.

Crespo, F. (Ed.), 1994. *Brucellosis ovina y caprina*. Office International des Epizooties, Paris, pp. 451.

Farrell, I.D., 1974. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Research in Veterinary Science* 16, 280–286.

Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M., 1992. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 79–83.

Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., Letesson, J.J., 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research* 36, 313–326.

Hamdy, M.E., Amin, A.S., 2002. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Veterinary Journal* 163, 299–305.

Hinic, V., Brodard, I., Thomann, A., Cvetnic, Z., Makaya, P.V., Frey, J., Abril, C., 2008. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *Journal of Microbiol Methods* 75, 375–378.

Ilhan, Z., Aksakal, A., Ekin, I.H., Gulhan, T., Solmaz, H., Erdenlig, S., 2008. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Letters in Applied Microbiology* 46, 301–306.

Leal-Klvezas, D.S., Martínez-Vázquez, I.O., López-Merino, A., Martínez-Soriano, J.P., 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 3087–3090.

Leyla, G., Kadri, G., Umran, O., 2003. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Veterinary Microbiology* 93, 53–61.

Lin, G.Z., Zheng, F.Y., Zhou, J.Z., Gong, X.W., Wang, G.H., Cao, X.A., Qiu, C.Q., 2011. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the omp25 gene for rapid detection of *Brucella* spp. *Molecular and Cellular Probes* 25, 126–129.

Lopez, A., Hitos, F., Perez, A., Navarro-Fierro, R.R., 1984. Lung lesions in bovine fetuses aborted by *Brucella abortus*. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 48, 275–277.

Marianelli, C., Martucciello, A., Tarantino, M., Vecchio, R., Iovane, G., Galiero, G., 2008. Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk. *Journal of Dairy Science* 91, 3779–3786.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., Notomi, T., 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 150–154.

Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16, 223–229.

Navarro, E., Segura, J.C., Castano, M.J., Solera, J., 2006. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. *Clinical Infectious Diseases* 42, 1266–1273.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28, E63.

O'Leary, S., Sheahan, M., Sweeney, T., 2006. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in Veterinary Science* 81, 170–176.

Ohtsuki, R., Kawamoto, K., Kato, Y., Shah, M.M., Ezaki, T., Makino, S.I., 2008. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1815–1823.

OIE, 2010. *Caprine and Ovine Brucellosis (excluding Brucella ovis)*. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (Chapter 2.7.2).

Ouahrani, S., Michaux, S., Sri, W.J., Bourg, G., Tournibize, R., Ramuz, M., Liautard, J.P., 1993. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *Journal of General Microbiology* 139, 3265–3273.

Author's personal copy

- Pan, W., Wang, J.-Y., Shen, H., Zhao, M., Ju, C., Dong, X., Yi, L., Chen, J.-D., 2011. Development and application of the novel visual loop-mediated isothermal amplification of Omp25 sequence for rapid detection of *Brucella* sp.. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10, 2120–2126.
- Perez, J., Quezada, M., Lopez, J., Casquet, O., Sierra, M.A., Martin de las, M.J., 1998. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10, 17–21.
- Peyrefitte, C.N., Boubis, L., Coudrier, D., Bouloy, M., Grandadam, M., Tolou, H.J., Plumet, S., 2008. Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of rift valley fever virus. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 3653–3659.
- Salih, D.A., Ali, A.M., Liu, Z., Bakheit, M.A., Taha, K.M., El Imam, A.H., Kullmann, B., El Hussein, A.M., Ahmed, J.S., Seitzer, U., 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Theileria lestoquardi*. *Parasitology Research* 110, 533–538.
- Seleem, M.N., Boyle, S.M., Sriranganathan, N., 2010. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology* 140, 392–398.
- Song, L., Li, J., Hou, S., Li, X., Chen, S., 2012. Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Brucella* spp and application to milk and blood samples. *Journal of Microbiological Methods* 90, 292–297.
- Tomaso, H., Kattar, M., Eickhoff, M., Wernery, U., Al, D.S., Straube, E., Neubauer, H., Scholz, H.C., 2010. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of *Brucellae* in tissue using quantitative real-time PCR. *BMC Infectious Diseases* 10, 100.
- World Health Organisation. 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations., World Organization for Animal Health., Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7. World Health Organization. Geneva.
- Xavier, M.N., Paixao, T.A., Poester, F.P., Lage, A.P., Santos, R.L., 2009. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *Journal of Comparative Pathology* 140, 149–157.
- Zhang, L.Q., Zhao, F.R., Liu, Z.G., Kong, W.L., Wang, H., Ouyang, Y., Liang, H.B., Zhang, C.Y., Qi, H.T., Huang, C.L., Guo, S.H., Zhang, G.H., 2012. Simple and rapid detection of swine hepatitis E virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Archives of Virology* 157, 2383–2388.



## ESTUDIO 2

Hindawi Publishing Corporation  
BioMed Research International  
Volume 2014, Article ID 353876, 7 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/353876>

## Research Article

## Assessment of Genetic Diversity of Zoonotic *Brucella* spp. Recovered from Livestock in Egypt Using Multiple Locus VNTR Analysis

Ahmed M. S. Menshawy,<sup>1</sup> Marta Perez-Sancho,<sup>2,3</sup> Teresa Garcia-Seco,<sup>2</sup>  
Hosein I. Hosein,<sup>1</sup> Nerea García,<sup>2</sup> Irene Martinez,<sup>2</sup> Ashraf E. Sayour,<sup>4</sup> Joaquín Goyache,<sup>2,3</sup>  
Ragab A. A. Azzam,<sup>1</sup> Lucas Dominguez,<sup>2,3</sup> and Julio Alvarez<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Beni-Suef University, Shamlaa Street, Beni-Suef 62511, Egypt

<sup>2</sup> Centro VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>4</sup> Department of Brucellosis, Animal Health Research Institute, Nadi-Elsaed Street, Dokki, Giza 12618, Egypt

<sup>5</sup> Servicio de Microbiología, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Carretera Colmenar Viejo, km. 9.100, 28034 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Julio Alvarez; [jalvarez@visavet.ucm.es](mailto:jalvarez@visavet.ucm.es)

Received 9 October 2013; Accepted 29 November 2013; Published 6 January 2014

Academic Editor: Andres Perez

Copyright © 2014 Ahmed M. S. Menshawy et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Brucellosis is endemic in most parts of Egypt, where it is caused mainly by *Brucella melitensis* biovar 3, and affects cattle and small ruminants in spite of ongoing efforts devoted to its control. Knowledge of the predominant *Brucella* species/strains circulating in a region is a prerequisite of a brucellosis control strategy. For this reason a study aiming at the evaluation of the phenotypic and genetic heterogeneity of a panel of 17 *Brucella* spp. isolates recovered from domestic ruminants (cattle, buffalo, sheep, and goat) from four governorates during a period of five years (2002–2007) was carried out using microbiological tests and molecular biology techniques (PCR, MLVA-15, and sequencing). Thirteen strains were identified as *B. melitensis* biovar 3 while all phenotypic and genetic techniques classified the remaining isolates as *B. abortus* ( $n = 2$ ) and *B. suis* biovar 1 ( $n = 2$ ). MLVA-15 yielded a high discriminatory power ( $h = 0.801$ ), indicating a high genetic diversity among the *B. melitensis* strains circulating among domestic ruminants in Egypt. This is the first report of the isolation of *B. suis* from cattle in Egypt which, coupled with the finding of *B. abortus*, suggests a potential role of livestock as reservoirs of several zoonotic *Brucella* species in the region.

### 1. Introduction

Since the first description of *B. melitensis* in Malta in 1897 [1], small ruminant brucellosis (SRB) has become a widespread problem in most Mediterranean countries as well as in other parts of the world (Middle East, Central Asia, and Latin America) [2].

In spite of the lack of precise information on the prevalence of ruminant brucellosis in Egypt, the disease is considered endemic in animals and humans in most parts of the

country [3] leading to an estimated yearly economic loss of approximately 60 million Egyptian pounds [4]. Several studies have attempted to determine the incidence of brucellosis in ruminants and humans in some regions of the country leading to a high variability of estimates depending mainly on the analyzed host species, geographic localization, and the serological technique used [5–8]. Predominance of smallholdings that favor close contacts between humans and animals, presence of mixed populations of animals, and consumption of unpasteurized milk and dairy products are

among the main major risk factors for *Brucella* infection present in Egypt [3, 7, 9]. Implementation of control measures of bovine brucellosis (test and slaughter, S19 vaccination) since the 1980's in the country led to a reduction on *B. abortus* incidence in cattle [3]. However, efforts directed to control small ruminant brucellosis have been less intensive, contributing to an increase of *B. melitensis* infection (considered the predominant *Brucella* species in Egypt nowadays) not only in sheep and goats, but also in cattle, buffaloes, and camels [3]. The identification and molecular characterization of prevailing *Brucella* species are a cornerstone to understand the epidemiology of the disease in a region and implement adequate strategies to control this important zoonosis [10]. For this reason, a study to evaluate the heterogeneity of *Brucella* spp. isolates recovered from domestic ruminants in different governorates of Egypt was conducted.

## 2. Materials and Methods

In 2002–2007 a total of 17 *Brucella* isolates were cultured according to OIE guidelines from samples (milk, aborted fetus, lymph node, and spleen) of domestic ruminants (buffalo, sheep, goat, and cattle) collected by convenience sampling in Assiut, Menofia, Beni-Suef, and Sharkia Governorates ( $n = 12$ ) and unknown locations ( $n = 5$ ) (Table 1, Figure 1). All animals were reactors to Buffered Acidified Plate Antigen Test (BAPAT), Rose Bengal Test (RBT), Tube Agglutination Test (TAT), Rivanol Test, and Complement Fixation Test (CFT). All *Brucella*-like isolates obtained in the following 14 days were classified using phenotypical methods (morphology, CO<sub>2</sub> requirements, H<sub>2</sub>S production, urease, catalase and oxidase activity, nitrate reduction, lactose fermentation, citrate utilization, grow in presence of thionine and fuchsin dyes (at different concentrations: 1:50,000 and 1:100,000), lysis by Tbilisi phage and agglutination with A and M anti-sera) in the Animal Health Research Institute (Giza, Egypt). *Brucella* DNA from all isolates was sent to the VISAVET Health Surveillance Centre for genetic identification and characterization. *Brucella* spp. identification was confirmed using a *Brucella*-specific PCR [11] and isolates were further characterized using the Bruce-ladder kit (Ingenasa, Tres Cantos, Spain). Isolates identified as *Brucella suis* were also analyzed using the Ingene Bruce-ladder Suis (Ingenasa) for serovar determination [12]. Finally, the whole panel was subjected to Multilocus Variable Number Tandem-Repeat analysis (MLVA-15) as described before [13]. The number of repetitions found in each locus was determined by band size assessment (according to Le Flèche et al. [13] instructions) and sequencing. Allelic diversity for each locus was determined according to Selander et al. [14] (adapted from Nei [15]). The genetic diversity was also calculated for *B. melitensis* isolates. Results were compared with those available in the database of *Brucella* from other African and Middle East countries (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/view.php>). All MLVA profiles not previously described have been submitted to the MLVA database (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>). A cluster anal-

ysis was performed using Neighbor Joining Analysis calculating the proportion of loci at which dissimilar alleles occur using MLST Data Analysis-Tree drawing (<http://pubmlst.org/perl/mlstanalyse/mlstanalyse.pl?site=pubmlst&page=treedraw&referer=pubmlst.org>).

## 3. Results and Discussion

Ruminant brucellosis is an endemic food-borne disease in most parts of Egypt and other developing countries of Africa. Recent studies [10, 16, 17] have highlighted the need of identifying the animal species infected with members of the genus *Brucella* to define their potential role in the transmission of this zoonotic pathogen and to determine the prevailing *Brucella* strains present in a region in order to adopt the most suitable control strategies.

Most (13/17) of the isolates recovered from ruminants in several governorates of Egypt were identified as *B. melitensis* biovar 3 in agreement with previous reports that described this *Brucella* species as the most prevalent in Egypt [3, 18] (Table 1). However, the unexpected phenotypic results (H<sub>2</sub>S production, urease, grow in presence of thionine and fuchsin dyes (at different concentrations: 1:50,000 and 1:100,000), lysis by Tbilisi phage, and agglutination with A and M anti-sera) of a subset of isolates ( $n = 4$ ) suggested their identification as non-*B. melitensis* (Table 2). Molecular identification using the Bruce-ladder kit identified in fact isolates 10–14 and 4–13 as *B. suis* and *B. abortus*, respectively. The Ingene Bruce-ladder Suis kit further identified the *B. suis* isolates as biovar 1.

*B. suis* isolates were cultured from milk (strain 10) and lymph node (strain 14) from two cows from Menofia and Beni-Suef Governorates, respectively. MLVA-15 analyses (Table 1) revealed that both isolates had typical but different *B. suis* biovar 1 patterns [13]. Zoonotic *B. suis* has been isolated in cattle elsewhere and it is becoming an emerging problem in several countries as Brazil and Colombia [19]. In this host species *B. suis* infection appears to be asymptomatic although biovar 1 shedding in milk has been described before [20] in agreement with our results. Although *B. suis* biovar 1 presence in swine has been reported previously in Egypt, its current distribution is unknown [21], and it had not been reported in cattle before. Brucellosis infection in swine has been described in the country usually by means of serological techniques [3, 22] that cannot distinguish between infections by the different *Brucella* spp. In Egypt, swine (with an approximate population of 30,000 animals [3]) may live in small groups in contact with other animals and humans [23]. As mentioned for *B. melitensis*, *B. suis* could be easily transmitted from swine to other animals and humans in these small holdings. To our knowledge, this is the first detection of the zoonotic biovar 1 of *Brucella suis* in cattle in Egypt. No information was available regarding potential contact between swine and the cattle from which *B. suis* was recovered in our study. However, taking into account the presence of a zoonotic *B. suis* biovar 1 in the region and the high number of reactors reported previously in swine populations located in different areas of Egypt (up to

TABLE 1: *Bruceella* spp. isolates recovered from livestock in Egypt (2002–2007) and examined by MLVA-15 technique included in the present study ( $n = 17$ ). Panel 1 includes eight minisatellite markers (Bruce 06–Bruce 55) and Panel 2 is composed of seven microsatellite markers (Bruce 18–Bruce 30). The number of tandem repeats observed in each marker is indicated in the corresponding cells.

| Id. strain | Sample     | Host    | Origin    | Year      | Specie (biovar)            | MLVA-15 Panel 1 |          |          |          |          |          |          |          | MLVA-15 Panel 2 |          |          |          |          |          |          |          |
|------------|------------|---------|-----------|-----------|----------------------------|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|            |            |         |           |           |                            | Bruce 06        | Bruce 08 | Bruce 11 | Bruce 12 | Bruce 13 | Bruce 42 | Bruce 43 | Bruce 45 | Bruce 55        | Bruce 18 | Bruce 21 | Bruce 04 | Bruce 07 | Bruce 09 | Bruce 16 | Bruce 30 |
| 5          | Lymph node | Cow     | ND*       | 2002–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 7        | 5        | 9        | 5        | 3        |
| 6          | Fetus      | Cow     | ND        | 2002–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 7        | 5        | 6        | 4        | 3        |
| 7          | Lymph node | Sheep   | Sharkia   | 2007      | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 7        | 8        | 5        | 7        | 5        | 8        | 3        |
| 8          | Spleen     | Cow     | ND        | 2002–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 7        | 8        | 6        | 5        | 8        | 4        | 3        |
| 9          | Lymph node | Cow     | ND        | 2006–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 7        | 5        | 9        | 5        | 3        |
| 11         | Lymph node | Cow     | Beni-Suef | 2006–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 7        | 5        | 6        | 4        | 3        |
| 12         | Lymph node | Cow     | Beni-Suef | 2006–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 7        | 5        | 9        | 5        | 3        |
| 15         | Lymph node | Cow     | Beni-Suef | 2006–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 7        | 5        | 7        | 4        | 3        |
| 16         | Lymph node | Sheep   | Beni-Suef | 2006–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 6        | 5        | 9        | 5        | 3        |
| 17         | Lymph node | Goat    | Beni-Suef | 2006–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 7        | 5        | 10       | 5        | 3        |
| 18         | Milk       | Buffalo | Beni-Suef | 2006–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 7        | 5        | 6        | 4        | 3        |
| 19         | Fetus      | Cow     | Beni-Suef | 2006–2007 | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 7        | 5        | 9        | 5        | 3        |
| 20         | Milk       | Buffalo | Assiut    | 2007      | <i>B. melitensis</i> bv. 3 | 3               | 5        | 3        | 13       | 1        | 1        | 1        | 3        | 3               | 8        | 8        | 6        | 5        | 6        | 6        | 3        |
| 10         | Milk       | Cow     | Menofia   | 2007      | <i>B. suis</i> bv. 1       | 2               | 3        | 6        | 10       | 4        | 1        | 1        | 5        | 2               | 4        | 9        | 6        | 6        | 5        | 5        | 3        |
| 14         | Lymph node | Cow     | Beni-Suef | 2006–2007 | <i>B. suis</i> bv. 1       | 2               | 3        | 6        | 10       | 4        | 1        | 1        | 5        | 2               | 4        | 9        | 5        | 5        | 8        | 6        | 3        |
| 13         | Spleen     | Cow     | Beni-Suef | 2006–2007 | <i>B. abortus</i>          | 4               | 5        | 4        | 12       | 2        | 3        | 3        | 3        | 3               | 6        | 8        | 3        | 7        | 3        | 3        | 5        |
| 4          | Milk       | Cow     | ND        | 2002–2007 | <i>B. abortus</i>          | 4               | 5        | 4        | 12       | 2        | 3        | 3        | 3        | 3               | 6        | 8        | 3        | 9        | 3        | 3        | 5        |

\*ND: non determined.

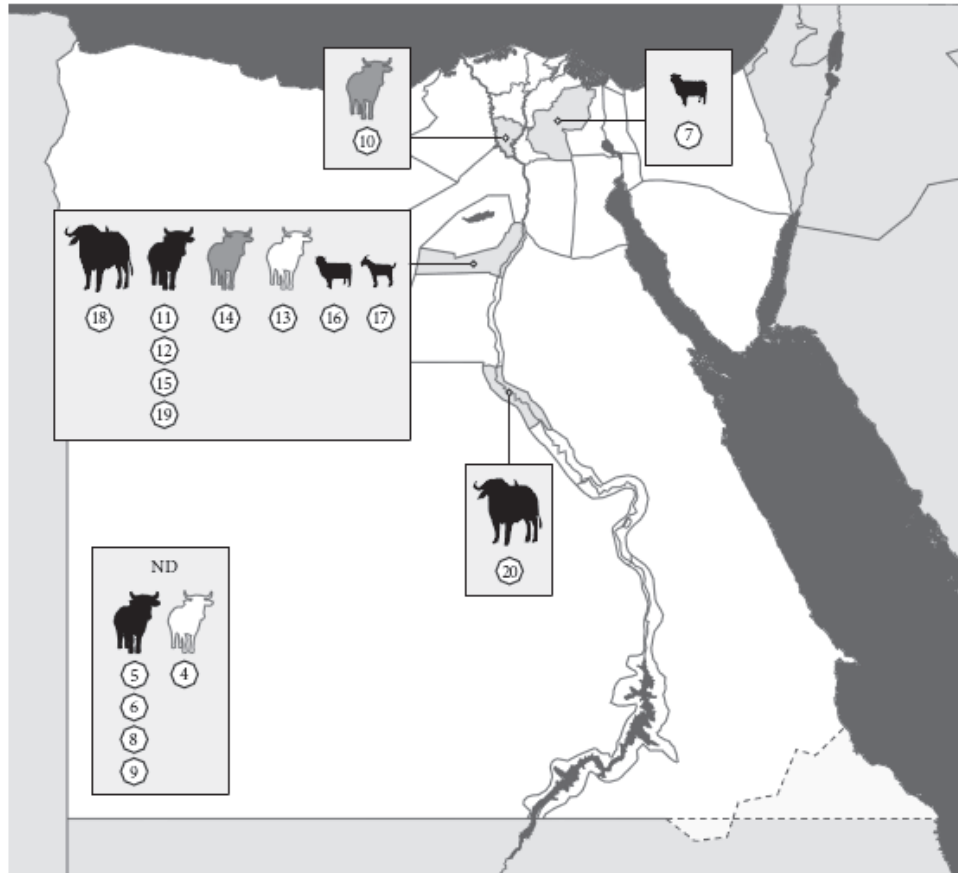


FIGURE 1: Geographical origin of the 17 *Brucella* spp. isolates (labeled from 4 to 20) recovered from livestock (buffalo, cattle, sheep, and goats) in Egypt during 2002–2007 (color of the animal indicates the *Brucella* species: *Brucella melitensis*, black; *B. suis*, grey animals, *B. abortus*, white).

TABLE 2: Differential phenotypic characteristics of *Brucella suis* (strains 10 and 14) and *B. abortus* (strains 4 and 13) isolated from cattle in Egypt, 2003–2007. Three reference strains (*B. melitensis* strain Ether, *B. suis* strain 1330, and *B. abortus* strain 544) are included for comparison.

|  | <i>B. melitensis</i><br>strain Ether | <i>B. suis</i> strain<br>1330 | <i>B. abortus</i> strain<br>544 | Strain 10/14<br>( <i>B. suis</i> ) | Strain 4/13<br>( <i>B. abortus</i> ) |
|--|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| H <sub>2</sub> S production                | –                                    | +++                           | +                               | +++                                | +++                                  |
| Urease activity                            | + in 18–24 h                         | ++ in <15 min                 | + in 2 h                        | ++ in<br>3–5 min                   | + in 2 h                             |
| Growth in presence of dye thionin 1:50000  | +                                    | +                             | –                               | +                                  | –                                    |
| Growth in presence of dye thionin 1:100000 | +                                    | +                             | –                               | +                                  | –                                    |
| Growth in presence of dye fuchsin 1:50000  | +                                    | –                             | +                               | –                                  | +                                    |
| Growth in presence of dye fuchsin 1:100000 | +                                    | –                             | +                               | –                                  | +                                    |
| Agglutination with A anti-sera             | +                                    | +                             | +                               | +                                  | +                                    |
| Agglutination with M anti-sera             | +                                    | –                             | –                               | –                                  | –                                    |



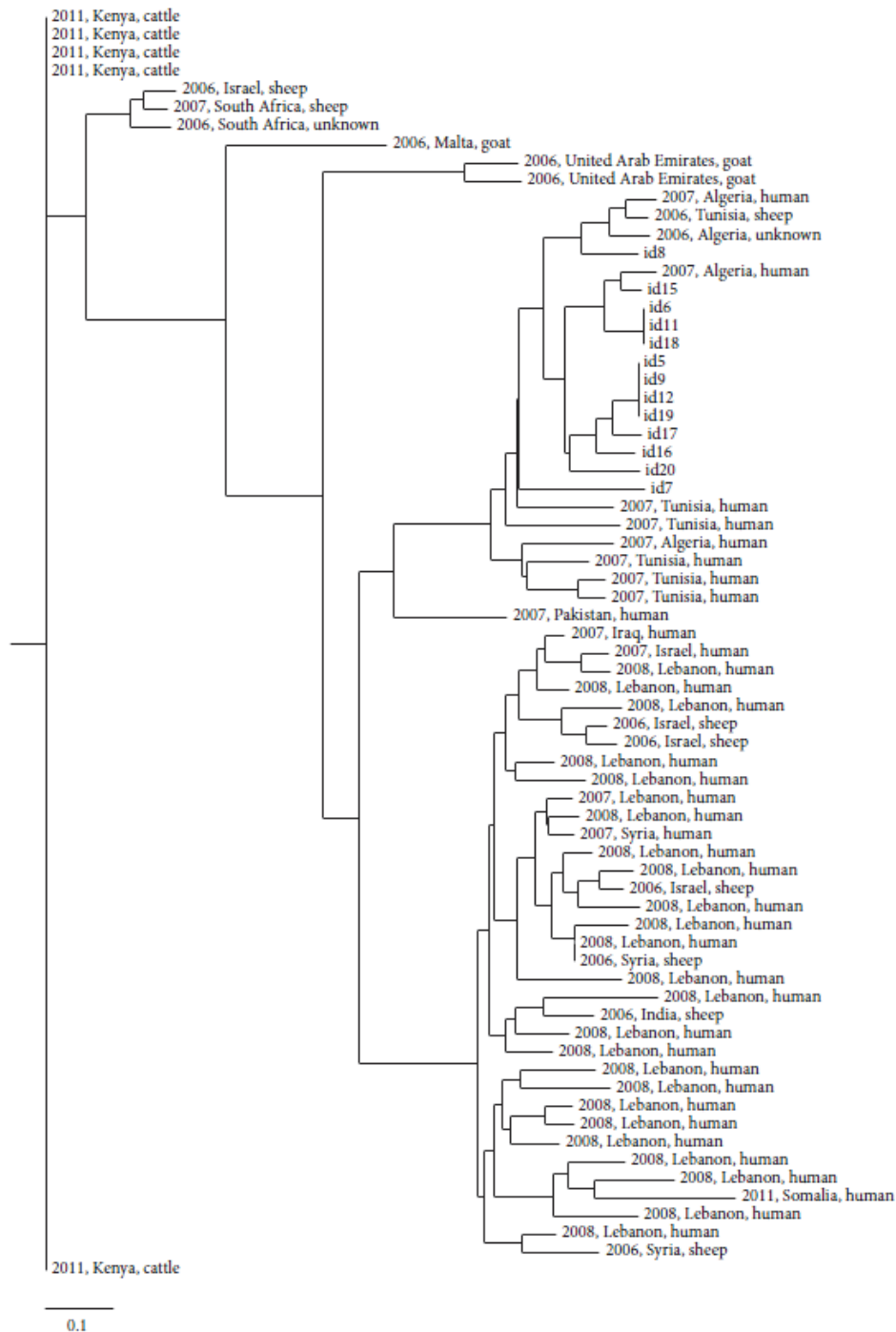


FIGURE 2: Neighbor Joining Analysis for the MLVA-15 profiles of 13 *B. melitensis* isolates recovered from domestic ruminants from Egypt in 2002–2007 compared with 57 isolates from Africa and Middle East recovered in 2006–2012 (source: <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/view.php>).

12.61% using RBT [23]), more efforts are needed in order to determine the importance of this animal species as a source of infection and to avoid spillover to other domestic animals and human.

The presence of *B. abortus* in cattle in Egypt was also demonstrated here in agreement with previous occasional reports [3]. One of the two different MLVA-15 patterns (Table 1) found in the two *B. abortus* strains matched existing profiles in the MLVA Bank-Microbes genotyping [13] including *B. abortus* RB51 strains [24, 25] isolated in USA, Italy, and Portugal. However, results of the Bruce-ladder kit ruled out a possible isolation of this vaccine strain. The other MLVA profile was not present in the MLVA database.

Nevertheless, the most prevalent *Brucella* species found in the study was *B. melitensis* as previously described. All isolates belonged to West Mediterranean Group (MLVA8 genotype 51). The genetic heterogeneity existing among the 13 isolates analyzed was high (Table 1), with a total of 8 different genotypes ( $h = 0.801$ ) (Figure 1), none of which had been included in the MLVA Bank-Microbes genotyping (*Brucella* Aggregated database, <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>). A high discriminatory power of MLVA-15 had been previously reported in *B. melitensis* isolates from Lebanon, Spain, and China [26–28]. In our study, the highest genetic heterogeneity was found in markers bruce 09 and bruce 16 ( $h = 0.712$  and  $h = 0.596$ , resp.) while only one allele was found in MLVA markers bruce 21 and bruce 30 from panel 2 and in all markers from panel 1. However, the Neighbor Joining Analysis clustered the Egyptian profiles obtained in this study with *B. melitensis* isolates in a large cluster with profiles from sheep and human isolates recovered in Algeria and Tunisia (Figure 2). Some authors have previously reported the limited value of panel 1 and panel 2A [27] to differentiate *B. melitensis* isolates recovered from the same geographical origin/outbreak [27, 28]. Our results also confirm the need of using markers of panel 2B to achieve a sufficient discriminatory capacity when isolates are geographically related.

#### 4. Conclusions

The high genetic heterogeneity found in this study and particularly the identification of zoonotic strains of *B. suis* and *B. abortus* isolated from samples from domestic ruminants suggest a complex underlying epidemiological situation in Egypt. In addition, our results demonstrate the usefulness of a complete phenotypic and genetic characterization of isolates to avoid misclassification of bacterial species belonging to the *Brucella* genus. Our study, although performed on a limited sample size, gives an insight in the current disease-causing *Brucella* species present in domestic ruminants in Egypt. Further studies aiming at the assessment of the prevalence of *B. suis* in domestic ruminants and swine in Egypt using adequate identification techniques would be needed in order to determine the importance of the infection due to this zoonotic pathogen in livestock in the region.

#### Conflict of Interests

None of the authors have any conflict of interests relating to this study.

#### Authors' Contribution

Ahmed M. S. Menshawy and Marta Perez-Sancho contributed equally to this paper.

#### Acknowledgments

This work is a contribution to the project AGL-2009-12674 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Marta Perez-Sancho was a recipient of a Predoctoral Grant from Comunidad de Madrid (IV Plan regional de investigación científica e innovación tecnológica, 20052008) y Fondo Social Europeo.

#### References

- [1] D. Bruce, "Note on the discovery of a microorganism in Malta fever," *Practitioner*, vol. 39, pp. 161–170, 1887.
- [2] FAO, *Brucella Melitensis in Eurasia and the Middle East*, vol. 10, 2009.
- [3] M. Refai, "Incidence and control of brucellosis in the Near East region," *Veterinary Microbiology*, vol. 90, no. 1–4, pp. 81–110, 2002.
- [4] AOAD, "Arab organization for agriculture development report," pp. 414–474, 1995.
- [5] A. El Sherbini, I. Kabbash, E. Schelling et al., "Seroprevalences and local variation of human and livestock brucellosis in two villages in Gharbia Governorate, Egypt," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 101, no. 9, pp. 923–928, 2007.
- [6] Y. M. Hegazy, B. Molina-Flores, H. Shafik, A. I. Ridler, and F. J. Guitian, "Ruminant brucellosis in Upper Egypt (2005–2008)," *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 101, no. 3–4, pp. 173–181, 2011.
- [7] H. R. Holt, M. M. Eltholth, Y. M. Hegazy, W. F. El-Tras, A. A. Tayel, and J. Guitian, "Brucella spp. infection in large ruminants in an endemic area of Egypt: cross-sectional study investigating seroprevalence, risk factors and livestock owner's knowledge, attitudes and practices (KAPs)," *BMC Public Health*, vol. 11, article 341, 2011.
- [8] H. Samaha, T. R. Mohamed, R. M. Khoudair, and H. M. Ashour, "Serodiagnosis of brucellosis in cattle and humans in Egypt," *Immunobiology*, vol. 214, no. 3, pp. 223–226, 2009.
- [9] Y. M. Hegazy, A. Moawad, S. Osman, A. Ridler, and J. Guitian, "Ruminant brucellosis in the Kafr El Sheikh governorate of the Nile Delta, Egypt: prevalence of a neglected zoonosis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 1, article e944, 2011.
- [10] J. Godfroid, S. Al Dahouk, G. Pappas et al., "A 'One Health' surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation," *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 36, no. 3, pp. 241–248, 2013.
- [11] V. Hinić, I. Brodard, A. Thomann et al., "Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 75, no. 2, pp. 375–378, 2008.

- [12] I. López-Góñi, D. García-Yoldi, C. M. Marín et al., "New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*," *Veterinary Microbiology*, vol. 154, no. 1-2, pp. 152-155, 2011.
- [13] P. Le Flèche, I. Jacques, M. Grayon et al., "Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay," *BMC Microbiology*, vol. 6, article 9, 2006.
- [14] R. K. Selander, D. A. Caugant, and H. Ochman, "Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 51, no. 5, pp. 873-884, 1986.
- [15] M. Nei, "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals," *Genetics*, vol. 89, no. 3, pp. 583-590, 1978.
- [16] J. Kasymbekov, J. Imanseitov, M. Ballif et al., "Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of livestock *Brucella melitensis* isolates from Naryn Oblast, Kyrgyzstan," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 2, Article ID e2047, 2013.
- [17] M. Sanogo, E. Abatih, E. Thys, D. Fretin, D. Berkvens, and C. Saegerman, "Importance of identification and typing of *Brucella* from West African cattle: a review," *Veterinary Microbiology*, vol. 164, no. 3-4, pp. 202-211, 2013.
- [18] H. Samaha, M. Al-Rowaily, R. M. Khoudair, and H. M. Ashour, "Multicenter study of brucellosis in Egypt," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, no. 12, pp. 1916-1918, 2008.
- [19] M. J. Corbel, "Brucellosis: an overview," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 3, no. 2, pp. 213-221, 1997.
- [20] D. R. Ewalt, J. B. Payeur, J. C. Rhyne, and P. L. Geer, "*Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study," *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 9, no. 4, pp. 417-420, 1997.
- [21] EFSA, "Scientific opinion of the panel on animal health and welfare (AHAW) on a request from the commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*)," *The EFSA Journal*, vol. 1144, pp. 1-112, 2009.
- [22] R. Zaki, "Brucella infection among ewes, camels and pigs in Egypt," *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, vol. 58, no. 2, pp. 145-151, 1948.
- [23] A. M. Barakat, H. A. El Fadaly, R. M. Shaapan, and F. A. M. Khalil, "Occupational health hazard of Egyptian employees in contact with wastage nourished swine," *Journal of American Science*, vol. 7, no. 1, pp. 808-813, 2011.
- [24] A. C. Ferreira, L. Chambel, T. Tenreiro et al., "MLVA16 typing of Portuguese human and animal *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 8, Article ID e42514, 2012.
- [25] G. Garofolo, M. Ancora, and G. E. Di, "MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 92, no. 2, pp. 103-107, 2013.
- [26] H. Jiang, M. Fan, J. Chen et al., "MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates," *BMC Microbiology*, vol. 11, article 256, 2011.
- [27] M. M. Kattar, R. F. Jaafar, G. F. Araj et al., "Evaluation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella* isolates in a region of brucellosis endemicity," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, no. 12, pp. 3935-3940, 2008.
- [28] S. Valdezate, A. Navarro, P. Villalón, G. Carrasco, and J. A. Sáez-Nieto, "Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella melitensis* strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and *rpoB* typing," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, no. 8, pp. 2734-2740, 2010.

## ESTUDIO 3

Research in Veterinary Science 90 (2011) 208–211



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rvsc](http://www.elsevier.com/locate/rvsc)Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain

Julio Álvarez<sup>a</sup>, Jose Luis Sáez<sup>b</sup>, Nerea García<sup>a</sup>, Carles Serrat<sup>c</sup>, Marta Pérez-Sancho<sup>a</sup>, Sergio González<sup>a</sup>,  
 Maria Jesús Ortega<sup>d</sup>, Josep Gou<sup>e</sup>, Lucio Carbajo<sup>b</sup>, Fulgencio Garrido<sup>d</sup>, Joaquín Goyache<sup>a,f,\*</sup>,  
 Lucas Domínguez<sup>a,f</sup>

<sup>a</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain<sup>b</sup> Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria, Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 28071 Madrid, Spain<sup>c</sup> Sección de Ganadería y Sanidad Animal en Girona, Generalitat de Catalunya, 17001 Girona, Spain<sup>d</sup> Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Centro Nacional de Referencia de Brucelosis Animales, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 18320 Santa Fe, Spain<sup>e</sup> Servicio de Sanidad Animal, Consejería de Agricultura, Alimentación y Acción Social Generalitat de Catalunya, 08071 Barcelona, Spain<sup>f</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 November 2009

Accepted 22 May 2010

## Keywords:

Brucellosis

*B. melitensis*

Cattle

Outbreak

Control

Zoonosis

## ABSTRACT

*Brucella melitensis* is a major human and animal pathogen, with a wide host range that includes all domestic ruminant species, although small ruminants are its preferred hosts. Outbreaks in cattle due to *B. melitensis* have become a worldwide emerging problem particularly difficult to control due to the lack of knowledge on the epidemiology in this host species and of an effective vaccine. However, combination of molecular tools and strict biosecurity measures can help to solve these difficulties and eventually eradicate the disease from infected herds. In the present report, management of an outbreak in Spain involving four farms, more than 2000 cattle and several human cases is described. Application of Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA) allowed identifying the most likely source of infection. Stamping out and test-and-slaughter strategies were applied, proving their usefulness to control the outbreak depending on infection level, and without the need of other alternative measures.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*B. melitensis*, causative agent of small ruminant brucellosis, is acquiring an increasing importance in bovine as an emergent pathogen (Corbel, 1997; Kahler, 2000). *B. melitensis* is also the main causative agent of human brucellosis, one of the most serious zoonoses all over the world (EFSA, 2007; OIE, 2008). The main source of infection for the population is consumption of unpasteurized milk and milk products, but other ways of infection such as respiratory or conjunctival routes have been described.

In several countries *B. melitensis* is the most frequently isolated species from all domestic ruminants (Refai, 2002). Outbreaks in cattle are often attributed to the presence of infected sheep and goat flocks in the surrounding area (Benkirane, 2006; Samaha et al., 2008). *B. melitensis* infection in cattle poses a serious problem to both farmers and veterinarians, because of the lack of information regarding several aspects of its epidemiology, such as cattle-to-cattle transmission or within-herd persistence of infection (Bercovich, 1998). Control of *B. melitensis* infection in cattle is impeded due to difficulties on the implementation of vaccination

strategies: although cross-species protection between *Brucella* species has been demonstrated using recombinant RB51 vaccine in mice (Vemulapalli et al., 2004), it has not been proven in cattle yet; *B. melitensis* vaccine (Rev1) have been applied before in cattle in developing countries (Denes, 1997) and its administration in this host species has been authorized by the European Union (Anon., 2002), but to our knowledge its usefulness to control *B. melitensis* outbreaks in cattle in developed countries has not been fully assessed. Thus, slaughtering of all exposed animals is one of the available options to control a *B. melitensis* outbreak in a cattle herd. Alternatively, if the infection level is low and the outbreak is detected at an early stage, the disease might be controlled and eventually eradicated through the implementation of very strict management procedures (Hamdy et al., 2008). This paper describes the management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* involving human cases and four cattle farms (A, B, C and D) in the north east of Spain using serological techniques, bacteriology and molecular characterization tools. Strategies followed depending on the epidemiological status of every premise are detailed in order to identify their potential usefulness.

**Farms management system:** Farms A, B and C were large dairy farms (>550 animals) that shared feed and milk transport and the veterinary services located in an area where no brucellosis

\* Corresponding author at: Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3943887; fax: +34 91 3943795.

E-mail address: [jgoyache@vet.ucm.es](mailto:jgoyache@vet.ucm.es) (J. Goyache).



vaccination had been performed since 2002. All three farms routinely send new born heifers to farm D (916 animals at the beginning of the outbreak), where they were served. These animals were kept in farm D for most of the pregnancy and approximately one week before calving the pregnant cows were sent back to their farms of origin. Before moving back, all animals were segregated within the previous 30 days before transportation to a separated pen ("pre-movement yard") and subjected to *Brucella* testing using Rose Bengale Test (RBT) (OIE, 2008). The pre-movement yard would hold approximately 18 animals.

**Outbreak:** On September 14th 2007 brucellosis was confirmed in a man that worked in farm A. Almost at the same time, routine tests performed as part of the Spanish brucellosis eradication program detected three positive reactors at the complement fixation test (CFT) with titers equal or above 20 international complement fixation test units (ICFTU)/ml (OIE, 2008) in the same farm (Table 1), located in an area where no bovine brucellosis had been detected for more than 6 years. Positive animals were slaughtered and sampled for bacteriology, and serological analysis were repeated on day 19 post-detection (p.d.) of the outbreak, revealing 53 reactors at CFT and/or RBT (Table 1). Epidemiologically connected farms B, C and D were also tested; in farm D only two positive reactors were found; both have just arrived four days before from farms A and B respectively, and consequently infection in their farms of origin was the most likely hypothesis. No more positive animals were detected in this farm on subsequent analysis. In farms B and C 131 and 23 reactors were detected in the first analysis (Table 1). Once the extent of the outbreak was determined, periodical testing of all animals from the four farms were performed (Table 1). Samples of animals from the three infected farms (A, B and C) that had been culled on the first tests were collected at abattoir to culture the *Brucella* strain involved in the outbreak. *B.*

*melitensis* was recovered from all samples, and cultures were identified as belonging to biotype 3 by agglutination with A and M-specific antisera (OIE, 2008). In addition, seven workers in total (four from farm A and three from farm B) were also found to be infected by *B. melitensis* biotype 3. No increase in the abortion rates in all four farms had been reported before the outbreak was detected.

Among possible sources of disease, infected sheep flocks located in the vicinity of farm D were considered as the most likely source. However, due to the fact that no positive animals were detected during the whole outbreak in this farm (with the exception of the two cows that were sero-positive only two days after arrival) this possibility was ruled out in the beginning. Nevertheless, a thorough investigation revealed that on the first week of May one sheep of unknown origin was kept in farm D for four days, showing a lack of appropriate biosecurity measures. On May 25th one cow that was about to return to farm C before calving aborted in farm D (in the pre-movement yard), and was then transported to farm C without any supplementary analysis following abortion. This animal was later positive in the first analysis performed in farm C, although it was negative in the pre-movement *Brucella* test carried out before the abortion. Most animals sharing the pre-movement yard with this animal were later positive in both RB and CF tests in the first analysis performed in their destination farms (A, B and C), even though they were also negative in pre-movement test. Therefore, the cow aborting on the 25th of May could have been the first case; animals infected in farm D would have spread the infection on their destination farms once they had been transported just before parturition.

**Molecular epidemiology:** In order to confirm the suspected link between cattle, human and sheep strains, five strains from farm A, three from farm B and one from farm C were submitted to the Spanish National Reference Laboratory for Animal Brucellosis for molecular characterization using multiple locus variable number tandem repeats analysis (MLVA) on 15 polymorphic loci (MLVA-15) as previously described (Le Fleche et al., 2006). In addition, isolates from two infected farm workers and from several positive sheep flocks located in the vicinity of farm D were analyzed. Comparison of the results observed in the eight conserved loci included in panel 1 by Le Fleche et al. (2006) with those available in the MLVA bank (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet>) revealed profile 51 was present in all strains. Patterns obtained in the seven highly variable loci included in panel 2 are summarized in Table 2. MLVA analysis revealed four different patterns in panel 2 due to polymorphisms on loci Bruce09 and Bruce16: profile I was identified in two cattle isolates from farm A, and profile II was present in one sheep strain, cattle isolates from farms A ( $n = 3$ ), B ( $n = 3$ ) and C ( $n = 1$ ) and in the two human isolates (Table 2).

**Outcome:** due to the large number of animals involved in this outbreak several options for its control were discussed. Finally, strategies were applied depending on the *B. melitensis* infection prevalence detected on every premise: the high numbers of reactors detected in farms A and B, together with the uncertainty about the possible evolution of the outbreak and sanitary and socio-economical reasons, made stamping out the most feasible control option, and all animals in both farms were culled 140 days after detection of the outbreak. A different approach was adopted on farm C, which had a lower seropositivity rate (Table 1): all animals were tested every 15–20 days using CFT and RBT, with immediate removal of positive reactors. Besides, biosecurity measures were maximized regarding handling of pregnant animals, disinfection of all material in contact with positive reactors, control of movement of all animals, etc. A similar strategy was established in farm D: all pregnant cows held in farm D were not moved back to their farms of origin before calving to avoid entering animals in the infected farms; instead, all cows calved in farm D in a separated area. Special care was taken to avoid any contact of these animals with

**Table 1**  
Results of serological analysis in farms A, B, C and D using Rose Bengal and complement fixation techniques.

| Farm | Day <sup>a</sup> | Analyzed samples | Positive samples <sup>b</sup> (%) | RB+ <sup>c</sup> | CF+ <sup>d</sup> |
|------|------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|
| A    | 0                | 579              | 3 (0.5)                           | 3                | 3                |
|      | 19               | 574              | 53 (9.2)                          | 48               | 50               |
|      | 53               | 656              | 28 (4.3)                          | 25               | 25               |
|      | 97               | 387              | 64 (16.5)                         | 60               | 15               |
|      | 127              | 272              | 24 (8.8)                          | 23               | 12               |
| B    | 34               | 596              | 131 (22)                          | 123              | 106              |
|      | 60               | 509              | 79 (15.6)                         | 72               | 54               |
|      | 96               | 344              | 121 (35.2)                        | 120              | 38               |
|      | 133              | 294              | 53 (18)                           | 50               | 37               |
|      | 39               | 642              | 23 (3.6)                          | 18               | 20               |
| C    | 55               | 528              | 6 (1.1)                           | 3                | 5                |
|      | 67               | 636              | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 90               | 515              | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 105              | 506              | 2 (0.4)                           | 2                | 2                |
|      | 125              | 493              | 0 (0)                             | 0                | 0                |
| D    | 147              | 628              | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 26               | 916              | 2                                 | 2                | 2                |
|      | 43               | 913              | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 54               | 67 <sup>e</sup>  | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 70               | 917              | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 80               | 8 <sup>e</sup>   | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 86               | 29 <sup>e</sup>  | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 100              | 59 <sup>e</sup>  | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 121              | 12 <sup>e</sup>  | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 131              | 945              | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 139              | 29 <sup>e</sup>  | 0 (0)                             | 0                | 0                |
|      | 148              | 17 <sup>e</sup>  | 0 (0)                             | 0                | 0                |

<sup>a</sup> All dates at referred to the day of first detection of the outbreak (14th September).

<sup>b</sup> Number of positive samples to the Rose Bengale and/or complement fixation tests.

<sup>c</sup> Number of positive samples to the Rose Bengale Test.

<sup>d</sup> Number of positive samples to the complement fixation test.

<sup>e</sup> Includes tests performed on heifers 8 and 30 days post-calving.

Table 2

Number of repetitions in tandem detected by multiple locus variable number tandem repeats analysis (MLVA) in highly discriminatory loci described by Le Fleche et al. (2006) in *Brucella melitensis* isolates from sheep, cattle and human samples.

| Number of isolates | Host   | Farm of origin | Bruce 18 | Bruce 21 | Bruce 04 | Bruce 07 | Bruce 09 <sup>a</sup> | Bruce 16 <sup>a</sup> | Bruce 30 | Profile |
|--------------------|--------|----------------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|-----------------------|----------|---------|
| 2                  | Cattle | A              | 7        | 8        | 7        | 6        | 9                     | 10                    | 3        | I       |
| 3                  | Cattle | A              | 7        | 8        | 7        | 6        | 8                     | 10                    | 3        | II      |
| 3                  | Cattle | B              | 7        | 8        | 7        | 6        | 8                     | 10                    | 3        | II      |
| 1                  | Cattle | C              | 7        | 8        | 7        | 6        | 8                     | 10                    | 3        | II      |
| 2                  | Human  | –              | 7        | 8        | 7        | 6        | 8                     | 10                    | 3        | II      |
| 1                  | Sheep  | –              | 7        | 8        | 7        | 6        | 8                     | 10                    | 3        | II      |
| 4                  | Sheep  | –              | 7        | 8        | 7        | 6        | 7                     | 10                    | 3        | III     |
| 1                  | Sheep  | –              | 7        | 8        | 7        | 6        | 7                     | 11                    | 3        | IV      |

<sup>a</sup> Loci were polymorphisms among isolates were found.

the rest of the cattle in farm D, as it could not be discarded that they were infected, in order to minimize the risk of spreading the infection. Handling of these high risk animals by human workers was performed with extreme care. The heifers were tested eight and 30 days post-birth to maximize the possibilities of detecting remaining infected animals after calving, in order to overcome difficulties in the diagnosis of *Brucella* infections in primiparous heifers, especially difficult to detect before calving.

The evolution of results of diagnostic tests confirmed the viability of a conservative approach to control the outbreak in farms C and D: on farm C only eight more reactors were detected on following tests (Table 1), and since then no more positive reactors have been detected by any diagnostic test, confirming the eradication of the disease. In farm D only two positive animals were detected and both were likely infected in their origin farms, although the origin of the outbreak could have taken place there; segregation of cows on the pre-movement yard would have made possible that only animals in that particular group would have been affected. Nevertheless all animals in this farm were also subjected to regular testing for more than one year. The management of the pregnant cows in this farm avoided the spread of the disease, therefore saving the heifers that were later used to restock farms A and B.

This *B. melitensis* outbreak affected seven workers and four cattle farms, involving more than 2000 animals. The absence of evident clinical signs together with a possible lack of detectable immune response to routine bovine brucellosis diagnostic test in infected primiparous heifers before abortion or calving make this kind of outbreaks an emerging problem difficult to handle. However, it was identified and controlled by minimizing the number of animals that had to be culled thanks to several key actions:

- Immediate control measures adopted when the first cases were reported allowed, through a complete epidemiological analysis, the detection of the most likely source of infection, an infected ovine flock near farm D.
- Culture and molecular characterization of the etiological agent from all host species involved confirmed the possible origin of the outbreak.
- Measures adopted on the different farms were based on the information available, avoiding the use of alternative measures as vaccination. An exhaustive diagnostic strategy was successfully implemented in farms C and D, removing all infected animals in approximately two months.

The application of a highly discriminative characterization technique found two profiles in the *B. melitensis* isolates from cattle, with subsequent repetition of the analysis confirming this result. Difference between the two patterns were focused on locus Bruce09, which had been described as the most polymorphic loci among MLVA-15 targets in different panels of *B. melitensis* strains

(García-Yoldi et al., 2007; Tiller et al., 2009). The two most likely explanations are a possible mutation in the outbreak strain leading to a different profile (with only one more TR repetition) or the involvement of two different strains in the outbreak, although the second profile could not be identified on other sheep strains from the same area, and therefore would be of unknown origin. Limited number of sheep strains typed in this study cannot rule out this possibility. However, although loci included in the MLVA-15 have demonstrated their usefulness for epidemiological purposes, occasional one-step increase or decrease changes in one or more loci have been reported before after *in vivo* and *in vitro* passages of *Brucella* strains (Whatmore et al., 2006; Kang et al., 2009). Therefore, the difference found in highly polymorphic locus Bruce09 cannot exclude a possible common origin of all cattle strains.

The present reports highlights the importance of maintaining strict biosecurity measures and regular testing of cattle herds, and routinely report cases of abortions for investigation in areas free of bovine brucellosis but where *B. melitensis* is present in small ruminants, as in some cases clinical presentation of the disease in cattle can go unnoticed.

#### Conflict of interest statement

None.

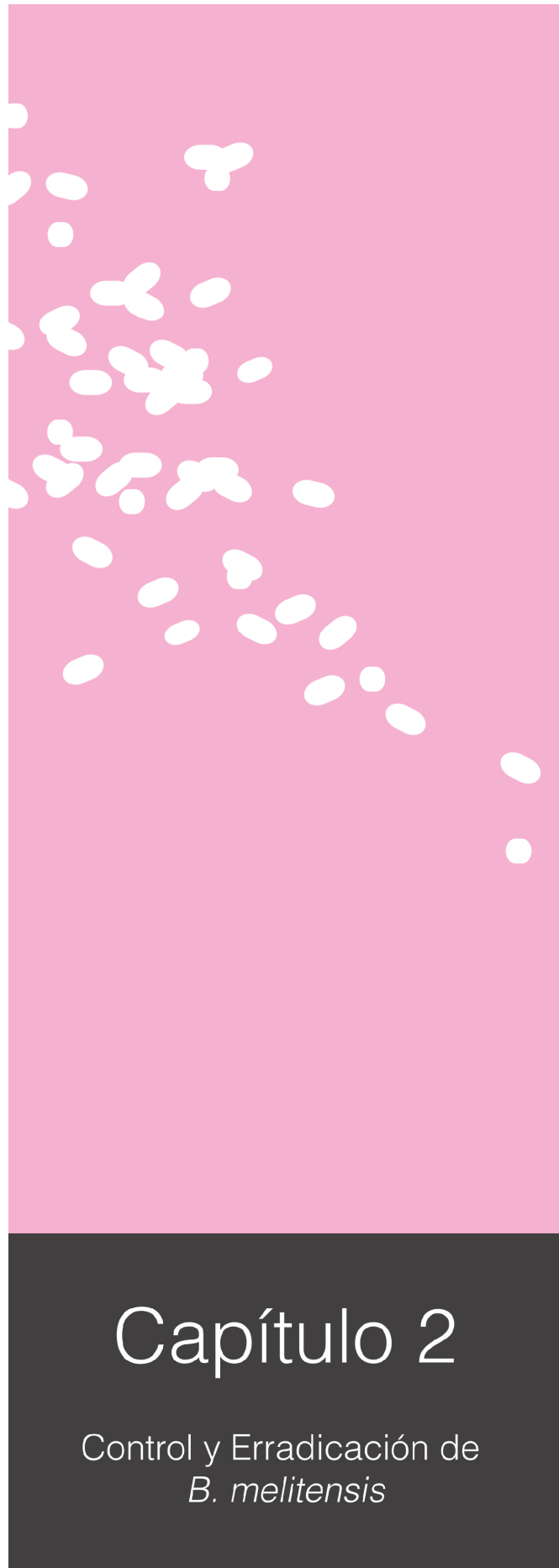
#### References

- Anon., 15, 2002. J. Eur. Commun. L194, 45–46.
- Benkirane, A., 2006. Ovine and caprine brucellosis: world distribution and control/eradication strategies in West Asia/North Africa region. *Small Ruminant Res.* 62, 19–25.
- Bercovich, Z., 1998. Maintenance of *Brucella abortus*-free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. *Vet. Q.* 20, 81–88.
- Corbel, M.J., 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213–221.
- Denes, B., 1997. Serological findings obtained in cattle herds immunised with the *Brucella melitensis* Rev.1 and the *B. abortus* B19 vaccine in Mongolia. *Acta Vet. Hung.* 45, 33–43.
- EFSA, 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA J.* 130.
- García-Yoldi, D., Le Fleche, P., Marin, C.M., de Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Vergnaud, G., Lopez-Goni, I., 2007. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Vaccine* 25, 2858–2862.
- Hamdy, M. E. R., Al-Qahtani, K. N., Al-Merekhi, A. E., 2008. *Brucella melitensis* in a dairy cattle herd in the state of Qatar. *Brucellosis 2008 International Research Conference*.
- Kahler, S.C., 2000. *Brucella melitensis* infection discovered in cattle for first time, goats also infected. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216, 648.
- Kang, S.L., Her, M., Heo, E.U., Nam, H.M., Jung, S.C., Cho, D., 2009. Molecular typing for epidemiological evaluation of *Brucella abortus* and *Brucella canis* isolated in Korea. *J. Microbiol. Methods* 78, 144–149.
- Le Fleche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeuf, F., Nockler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L.A., Vergnaud, G., 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 6.

- OIE, 2008. Caprine and Ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals Chapter 2.4.2.
- Refai, M., 2002. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet. Microbiol. 90, 81–110.
- Saraha, H., Al-Rowaily, M., Khoudair, R.M., Ashour, H.M., 2008. Multicenter study of brucellosis in Egypt. Emerg. Infect. Dis. 14, 1916–1918.
- Tiller, R.V., De, B.K., Boshra, M., Huynh, L.Y., Van Ert, M.N., Wagner, D.M., Klena, J., Mohsen, T.S., El-Shafie, S.S., Keim, P., Hoffmaster, A.R., Wilkins, P.P., Fimentel, G., 2009. Comparison of two multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis methods for molecular strain typing of human *Brucella melitensis* isolates from the Middle East. J. Clin. Microbiol. 47, 2226–2231.
- Vemulapalli, R., Contreras, A., Sanakkayala, N., Sriranganathan, N., Boyle, S.M., Schurig, G.G., 2004. Enhanced efficacy of recombinant *Brucella abortus* RB51 vaccines against *B. melitensis* infection in mice. Vet. Microbiol. 102, 237–245.
- Whatmore, Adrian M., Shankster, S.J., Perrett, L.L., Murphy, T.J., Brew, S.D., Thirlwall, R.E., Cutler, S.J., MacMillan, A.P., 2006. Identification and characterization of Variable-Number Tandem-Repeat Markers for typing of *Brucella* spp. J. Clin. Microbiol. 44, 1982–1993.







## Capítulo 2

Control y Erradicación de  
*B. melitensis*



## RESUMEN

La vacunación es la piedra angular de la lucha contra la brucelosis de los pequeños rumiantes en muchos escenarios epidemiológicos (prevalencia media/alta, recursos económicos limitados, prácticas de manejo como el nomadismo o el aprovechamiento de pastos comunales, etc.). La Rev. 1 se considera la vacuna más eficaz disponible actualmente para el control de la brucelosis en los pequeños rumiantes. A pesar de ello, existen una serie de inconvenientes que limitan su aplicación en el campo, principalmente su virulencia residual en hembras gestantes y la inducción de anticuerpos que producen interferencia diagnóstica en las pruebas serológicas. Con el fin de minimizar estos efectos adversos, se ha instaurado como práctica habitual la vacunación por vía conjuntival restringida a corderas de 3-6 meses de edad. De este modo, cuando los animales adquieren la edad de entrar en los programas de lucha contra BOC, el nivel de anticuerpos vacunales habrá descendido minimizando así las reacciones positivas derivadas de la inmunización con Rev.1. A pesar de las bondades que presenta este protocolo, existen una serie de inconvenientes que complican su aplicación en el campo: la dificultad para retener a los animales para inocular la dosis adecuada en la conjuntiva, el riesgo de difusión de la cepa vacunal viva derivada de este sistema de inmunización (con la consecuente posible contaminación del operador y el medio ambiente) y la

posibilidad de persistencia de animales reactivos a algunas pruebas serológicas empleadas en el diagnóstico de BOC.

El primer trabajo de este capítulo aborda la evaluación de una nueva ruta de vacunación con Rev. 1 en pequeños rumiantes: la vía intradérmica (ID). La dermis es una candidata como diana para la inmunización, como se ha demostrado en el caso de la rabia. Además permite el uso de dispositivos automáticos sin agujas que facilitan la inmunización de un gran número de animales en cortos periodos de tiempo, reduciendo el riesgo de accidentes derivados del uso de agujas y la formación de aerosoles (especialmente importante cuando se emplean vacunas vivas con virulencia residual como la Rev. 1). En este estudio se describen los resultados obtenidos en un total de 244 ovejas de edades comprendidas entre los 3 y los 6 meses, todas provenientes de tres granjas libres de brucelosis (91/68/EEC, RD1047/2003). Los animales se dividieron en cuatro grupos experimentales: 64 animales fueron vacunados por la vía ID, 68 por la vía CJ, 64 por la SC y 48 animales fueron controles (no vacunados), y sus respuestas serológicas fueron monitorizadas durante 10 meses utilizando varias técnicas (RB, FC, FPA, ELISAI y ELISAb). Los animales del grupo ID mostraron una respuesta serológica post-vacunal rápida (79.4% reactivos a RB-FC a los 14 días tras la vacunación), generalizada (85% reactivos a ELISAb) e intensa (valores cuantitativos en ELISAb significativamente mayores que los observados en el grupo SC a partir de los 90 días tras la vacunación), siendo más duradera que la del grupo SC (38.8% y 5.6% reactivos a RB-FC a los 285 días de estudio, respectivamente). El grupo conjuntival registró la respuesta serológica menos intensa, confirmando la utilidad de esta vía para la diferenciación de los animales vacunados de animales infectados por cepas de campo. Además se pusieron de manifiesto importantes diferencias respecto a la capacidad de las distintas técnicas diagnósticas evaluadas para detectar anticuerpos frente a Rev. 1. El FPA presentó una especificidad adecuada, comparable a la de la interpretación en serie de RB-CF, mientras que ambos ELISAs detectaron una importante proporción de reactivos al final del estudio. Los animales pertenecientes a la granja 3 presentaron una respuesta generalizada mayor que aquellos individuos pertenecientes a las granjas 1 y 2, posiblemente debido a la existencia de otros microorganismos circulantes en esta granja que pudieran dar reacciones cruzadas en las pruebas serológicas empleadas. La larga duración de la

respuesta serológica inducida por la vacunación intradérmica con Rev. 1 en ovejas la convierte en una alternativa incompatible con los programas de erradicación basados en el diagnóstico y sacrificio de reactivos. Sin embargo esta vía puede ser una opción factible en áreas en desarrollo con recursos limitados donde el sacrificio de animales reactivos no es posible y la brucelosis suele ser un problema endémico. Con el fin de comprobar la protección inducida por la vacunación intradérmica con Rev. 1 comparada con las otras vías clásicas de eficacia demostrada se llevó a cabo un desafío experimental de un subgrupo de los animales (n=87) incluidos en el estudio anterior. Las ovejas primíparas fueron inseminadas e infectadas experimentalmente con una dosis de  $5 \times 10^7$  UFC/animal de *B. melitensis* 53H38 por la vía conjuntival durante el último tercio de gestación (aproximadamente a los 90 días). Todos los animales del grupo control (que no habían sido previamente inmunizados) experimentaron un aborto por *B. melitensis*. El grupo de animales vacunados (CJ=21; SC=24, ID=27) sufrió una tormenta de abortos entre los 22 y 64 días tras el desafío. Un estudio de paternidad permitió la asignación madre-hijo en el 70% de los casos aproximadamente. No se observaron diferencias significativas en el número de fallos reproductivos observados en los diferentes grupos vacunales (CJ=86.7%, SC=68.8% e ID= 78.9%) pero sí entre los animales vacunados (78%) y el grupo control (100%). Sin embargo, el alto porcentaje de fallos reproductivos observado en todos los grupos vacunales (incluyendo los grupos CJ y SC utilizados como referencia en el estudio) no permiten extraer conclusiones definitivas sobre la validez de la vía ID como ruta alternativa para la inmunización de corderas frente a *B. melitensis*. Si bien algunos factores [la mayor susceptibilidad de las razas de aptitud láctea, descrita anteriormente en la raza awassi, muy relacionada con la raza assaf a la que pertenecían los animales utilizados en este estudio, el gran número de gestaciones múltiples registradas, la posible inmunosupresión asociada al transporte que tuvo lugar aproximadamente dos semanas antes del desafío y la posible exposición a otros agentes abortivos (*Chlamydia abortus*)] pudieron contribuir al bajo nivel de protección observado tras la vacunación con Rev. 1 observado en este estudio, sería necesaria la realización de estudios específicos para determinar el posible impacto de estos factores sobre la respuesta a la Rev. 1 con el fin de valorar la relevancia de las observaciones aquí descritas.

El segundo trabajo de este capítulo describe el estudio de la respuesta inmune celular (producción de IFN- $\gamma$ ) en tres escenarios diferentes (animales no expuestos a *Brucella* spp., tras la vacunación con Rev. 1 y tras una infección experimental con *B. melitensis* 53H38). La respuesta de IFN- $\gamma$  en animales sin exposición previa a la bacteria puso de manifiesto una posible falta de especificidad de esta aproximación diagnóstica cuando se analizan ovejas menores de 1 año. En el caso de la respuesta post-vacunal, la monitorización de la producción de esta citoquina evidenció la ausencia de diferencias significativas en la producción de IFN- $\gamma$  independientemente de la vía de vacunación (CJ, SC o ID) a partir de las dos semanas tras la vacunación. Este hallazgo sugiere una capacidad similar de todas las vías de inmunización para inducir una adecuada estimulación de la respuesta inmune celular, y contrasta con lo observado utilizando técnicas serológicas, con las que se obtuvieron grandes diferencias en función del grupo vacunal. La ausencia de diferencias en el grado de producción de la citoquina entre los animales de las distintas explotaciones parece indicar que las ovejas de la granja 3, en la que se registró un mayor nivel de seropositividad, no tuvieron una mayor exposición antigénica a *Brucella* spp., reforzando así la hipótesis de la existencia de reacciones inespecíficas en las pruebas serológicas empleadas. Por otra parte, la ausencia de correlación entre la respuesta serológica observada tras la vacunación y la protección conferida por ésta, descrita con anterioridad en repetidos ensayos, demuestra la limitada utilidad de las técnicas basadas en la detección de la respuesta inmune humoral para evaluar la eficacia de vacunación aplicada. Nuestros resultados sugieren que, sin embargo, la detección del interferón podría ser una herramienta útil para este fin. Por último, la monitorización de la producción de IFN- $\gamma$  en ovejas preñadas desafiadas con 53H38 a los 90 días de gestación puso de manifiesto una cierta asociación entre el aborto observado tras la infección por *Brucella* y la producción de esta citoquina. Este hecho indica que el estudio del IFN- $\gamma$  podría ser una herramienta útil para monitorizar la evolución de la infección en ovejas infectadas por *B. melitensis* y predecir la aparición de fallos reproductivos producidos por este patógeno.

El tercer estudio del presente capítulo incluye un estudio sobre la cepa rugosa B115 de *B. melitensis* como posible candidata para la inmunización contra *B. melitensis* en pequeños rumiantes. El fenotipo rugoso de esta cepa (cuya eficacia

contra *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. abortus* ha sido demostrada en el modelo murino) permite evitar la interferencia diagnóstica asociada al LPS de las cepas lisas de *Brucella*. Como primer paso, se evaluó la virulencia de esta cepa rugosa en hembras gestantes con el fin de valorar su potencial aplicación en campañas de vacunación en sávana (sin considerar el estado reproductivo de los animales vacunados). Para ello, se incluyeron en un total de 11 ovejas preñadas de raza Manchega de un año de edad originarias de una granja oficialmente libre de brucelosis (91/68/EEC, RD1047/2003). Todas las hembras estaban aproximadamente en el día 90 de gestación al inicio del estudio: 8 animales fueron vacunados con una dosis de  $1-2 \times 10^9$  UFC B115 por la vía subcutánea y el resto de animales ( $n=3$ ) permaneció como grupo control (no vacunado) para valorar la posible transmisión horizontal de la cepa vacunal estudiada. El número de abortos inducidos por la vacunación (5/8) y la posible transmisión horizontal observada (se aisló B115 en un animal no vacunado que sufrió un aborto) desaconsejan el uso de esta cepa para la inmunización de ovejas sin considerar el estado reproductivo de la cabaña ganadera. Por otro lado, el fenotipo rugoso de todos los aislados fue confirmado por la tinción de Cristal Violeta, excepto en cuatro aislados procedentes de una oveja vacunada que resultó tener una mezcla de bacterias de fenotipo liso y rugoso. La prueba MLVA confirmó el mismo perfil genético en un aislado liso y rugoso, sugiriendo una posible mutación de B115 de fenotipo rugoso a liso. Esta evidencia de la posible falta de estabilidad *in vivo* de la cepa B115, que podría relacionarse con una pérdida de su atenuación, también representa una importante limitación para su aplicación en condiciones de campo. A pesar de estos efectos adversos, la escasa proporción (tan sólo un animal fue positivo en el día 91 de estudio) de reactores a las pruebas de RB y FC interpretadas en serie puso de manifiesto la utilidad de la aplicación de cepas rugosas para la inmunización de ovejas y cabras en el contexto de un programa de control y erradicación de BOC como el que se lleva a cabo en España. Los interesantes resultados obtenidos en este estudio avalan la realización de más experiencias con el fin de evaluar la protección inducida por B115 en ovejas y cabras y, sobre todo, su estabilidad *in vivo*.

## ESTUDIO 1

**Evaluation of the suitability of the intradermal route for Rev. 1 vaccination in ewes and comparison with classical routes.**

When test and cull programmes are in place for control of small ruminant brucellosis, Rev. 1 vaccination is usually applied in 3-6 months animal only using the conjunctival (CJ) route to avoid cross-reacting antibodies induced by Rev.1 subcutaneous (SC) vaccination. CJ route may have practical limitations, particularly when large numbers of animals are immunised. In this study, the immunogenicity of Rev. 1 intradermal (ID) vaccination, applied using a needle free injector, was evaluated in 64 ewes of 3-6 months of age using classical and alternative serological techniques and compared with that observed in ewes vaccinated by CJ (n=68) and SC (n=64) routes and in a non-vaccinated group (NV, n=48). The protection induced by Rev. 1 vaccination using the three routes against an experimental challenge was assessed in a subset of animals (n=87) that were kept away from their respective flocks just prior to challenge. ID-vaccination induced a rapid, longer and stronger response than SC and CJ vaccination as determined by the serological tests. The experimental challenge lead to a high proportion of abortions in all groups (> 75%), suggesting an unusually low degree of protection conferred by Rev. 1 vaccination. Our results showed the immunogenicity Rev. 1 ID vaccination, but also the lack of correlation between post-vaccination responses and protection afforded against an experimental infection. However, the lack of protection conferred in a large proportion of vaccinated animals makes difficult to draw conclusions about the efficacy of ID Rev. 1 immunization against *B. melitensis*.

## INTRODUCTION

*Brucella melitensis* is the major causative agent of brucellosis in sheep and goats (Small Ruminant Brucellosis, SRB) (OIE, 2009b). SRB represents an important problem in Mediterranean countries, the Middle East, Central Asia and Latin America (FAO 2009). *B. melitensis* is the species most frequently involved in human disease and in some areas is becoming an emerging pathogen in cattle (Álvarez *et al.*, 2010;



Corbel 1997; Samaha *et al.* 2008). Control and eradication of animal brucellosis remains as the most useful public health prevention tool to avoid human disease (Corbel, 1997). Moreover, SRB has a major economic impact in animal production due to direct and indirect losses (Crespo, 1994).

Extensive efforts to control and eradicate SRB, usually through programmes based on periodical test-and-slaughter and Rev. 1 vaccination, have been conducted in several developed countries (Godfroid *et al.*, 2011). Rev. 1 is still considered the best vaccine available for the control of SRB in spite of its drawbacks, such as the long-lasting cross reacting antibodies induced after subcutaneous (SC) vaccination that may interfere in routine serological testing. Conjunctival (CJ) vaccination of young animals (< 6 months of age) has been recognized as a suitable alternative to SC route because it induces a sufficient protection and may overcome the diagnostic interference problem due to the lower persistence of the elicited antibody response (Fensterbank *et al.*, 1982a; Fensterbank *et al.*, 1985). In spite of the advantages of the CJ route (Fensterbank *et al.*, 1985), difficulties in animal restraint may lead to inaccurate dosage and risk of contamination of the environment and/or the operators during inoculation. In addition some false positive reactions due to Rev. 1 vaccination may still occur.

The intradermal (ID) route has been described as a potential efficient and safe alternative for vaccination against diseases like rabies in humans (Nicolas, 2008; World Health Organization, 1970 /id}, eliciting an adequate immune attributed to the presence of cells able to recognise and process foreign antigens in dermis (Lambert y Laurent, 2008). The skin is one of the possible sites of entry of *B. melitensis* in the host (World Health Organisation, Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Organization for Animal Health, 2006) and thus may be an adequate target for the 'controlled' infection required to induce an effective protection after vaccination with a live vaccine (Herzberg and Elberg, 1953). Intradermal vaccination can be combined with the use of needle-free injection systems that allow rapid vaccination of large numbers of animals (Mousel *et al.*, 2008) and can reduce the risk of needle stick injury and transmission of blood borne pathogens (Lambert y Laurent, 2008). These advantages are particularly suited for vaccination using live strains with residual virulence, as those required for control of animal brucellosis. However, usefulness of

this route for prophylaxis of SRB has never been assessed and only scarce data exist on its value against brucellosis in other animal species, with contradictory results (Cotton, 1953; Goel y Bhatnagar, 2012; Lim, 1988; Nicoletti, 1976; Nicoletti, 1984). Therefore, before further consideration of the ID route as an alternative for Rev. 1 vaccination, evidences demonstrating its ability to adequately stimulate the immune system of vaccinated animals and induce a sufficient protection are needed.

Studies for evaluation of the suitability of vaccines against brucellosis must adhere to certain principles (use of a minimum number of animals, inclusion of a non-vaccinated control group as well as a group immunized with the reference vaccination protocol, use of certain inoculation doses at the moment of maximum susceptibility of the animals) in order to allow comparison with previous evidences (Bosseray, 1992). In this context, a study was conducted aiming at the assessment of the serological response observed in 244 female lambs up to one year after a Rev. 1 ID vaccination using some of the most widely applied serological diagnostic test [rose bengal test (RBT), complement fixation test (CFT)], indirect ELISA (iELISA), blocking ELISA (bELISA) and fluorescence polarization assay (FPA)]. The response in the ID-vaccinated animals was compared with that observed in animals vaccinated by the SC and CJ routes. In addition, an evaluation of the protection afforded by the three routes against a 53H38 challenge at the midpregnancy of the first gestation was also carried out in a subset of animals.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design.

**1. Vaccination:** A total of 244 3-6 months old *Assaf* ewes were randomly selected from three brucellosis-free Spanish flocks (flock 1:  $n = 82$ ; flock 2:  $n = 85$ ; flock 3:  $n = 77$ ), with a median age of 102 days (interquartile range, IQR 92-111 days) at the beginning of the study. Flocks were brucellosis-free according to European and national regulations (91/68/EEC, Spanish Royal Decree 2611/1996). In each flock sheep were allocated randomly in four experimental groups, depending on the route of vaccination: CJg (flock 1:19; flock 2: 28; flock 3:21), SCg (19, 30, 15), IDg (25, 19, 20) and a non-vaccinated control group (NVg; 19, 8, 21) (Tables 1-4).

Animals were immunised using the *B. melitensis* Rev. 1 OCUREV® (CJ administration) and CZV REV1® (SC and ID routes) vaccines, kindly supplied by CZ Veterinaria (Porriño, Pontevedra, Spain). Vaccines were kept lyophilised and reconstituted immediately before inoculation using buffered saline solution according to the manufacturer's instructions. Animals belonging to the CJ group (CJg) were immunised with a volume of 33 µL for a final dose of  $1\text{-}2\cdot 10^9$  colony forming units (CFU). Ewes in the SC group (SCg) received a dose of  $1\text{-}2\cdot 10^9$  CFU in 1 mL administered in the axillary region. ID vaccinated animals (IDg) were administered a dose of  $1\text{-}2\cdot 10^9$  CFU in a volume of 100 µL in the brachial region using a needle-free jet injector supplied by PharmaJet (Golden, Colorado, USA). All animals were immunised within the same week.

Within each flock animals were maintained in different lots although occasional contact between them occurred, and food and water were provided *ad libitum* during the whole period of study. All experimental animals were managed using the same practices followed for the rest of the sheep in each flock.

**2. Experimental challenge:** the protection afforded by the vaccination was evaluated in a subset of these animals (n=87, CJg, n= 21; SCg, n= 24; IDg, n= 27 and NVg= 15) during their first pregnancy when animals were 13-16 months old. After oestrus synchronization, all animals were mated by artificial insemination using frozen semen. Each animal was infected with a dose of  $5\cdot 10^7$  CFU of 53H38 *B. melitensis* deposited in the conjunctiva during the beginning of the last third of pregnancy, at approximately 90 days of pregnancy (and around 300 days after vaccination). The challenge strain was supplied by the National Reference Laboratory for Animal Brucellosis (Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe, Granada, Spain), and a final volume of 33µL was placed in each eye of all challenged sheep. During this stage, vaccinated and control animals were kept separately in restricted facilities under strict biosecurity measures, in two groups (one including all vaccinated sheep and the other containing only the NVg). All husbandry practices and animal procedures were authorised by the scientific and animal experiments committee of Complutense University of Madrid and animal research committee from Madrid Region (approval number 10/549484.9/09).

### Sample collection after vaccination and challenge.

Serum samples were collected from the jugular vein at 0 (before immunisation), 7, 14, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days post-vaccination (d.p.v.) (Fig. 1). To evaluate the long-lasting immune response induced by the different vaccine deliveries, a subset of animals among those being selected for the challenge trial (NVg = 32, CJg = 50, SCg = 54 and IDg = 49) were also sampled at 285 d.p.v. Serum samples were frozen until the analyses were carried out. In addition, a total of 98 parpebral swabs were collected at 7 (n= 35), 14 (n=32) and 21 (n=31) d.p.v. from animals selected randomly from all groups from the three flocks (CJg= 34, SCg =31 and IDg= 33) in order to assess the risk of shedding of the vaccine strain.

After the challenge, sera from each animal (SCg, CJg, IDg and NVg) were collected weekly for 84 and 42 days after infection (d.p.i.). in the vaccinated and control animals, respectively.

Vaginal swabs were collected from all animals within 7 days after parturition/abortion. A subset of animals (n=19) was also sampled for milk on the same days parturition/abortion occurred and/or 7 days after. Samples from spleen, lung and/or stomach content were collected from fetuses and subjected to bacteriological analysis. Similarly, samples from liver and/or spleen of viable lambs (survived at least 15 days after parturition) were collected. These samples were stored at -20°C until further analysis.

### Clinical findings.

Animals belonging to the IDg were monitored in order to detect local or general reactions for 21 days following vaccination. After challenge, all animals were checked daily to assess the occurrence of abortion/parturition and any clinical sign of disease (weakness, anorexia, etc.).

In order to confirm the correct assignment of each -lambs/fetus to their corresponding mother, a paternity analysis was carried out. Total DNA was isolated from liver (for fetuses), spleen (for ewes) and semen samples using the DNeasy Blood and Tissue (Hilden, Germany). Samples were genotyped for 16 microsatellite markers in an automatic sequencer ABI 310 using the GeneMapper software (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Microsatellite information and paternity assignment

analyses were carried out using the program CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 1998).

### Diagnostic test and laboratory determinations.

All serum samples were submitted to the Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe (Spanish Reference Laboratory for animal brucellosis) for their analysis using RBT and CFT as described before (Durán-Ferrer *et al.* 2004). Antigen suspensions were prepared from *Brucella abortus* strain S99 according to the OIE international standard (Anon, 2000). RBT was performed following the classical method on a flat glass plate (Alton *et al.* 1988; Anon 2000). CFT was performed in microtitre plates with 96 round-bottomed wells according to the warm method of Alton *et al.* (Alton *et al.* 1988); cut-off was established at 1/4 dilution and 50% fixation. During vaccination stage, results from the RBT and CFT were combined in a serial interpretation of both tests according to the Spanish national eradication program for small ruminant brucellosis for vaccinated flocks (Ministerio de Agricultura 2013). However, the RBT and CFT results after challenge were analyzed in a parallel interpretation. FPA was performed according to the manufacture instructions (*Brucella* S Antibody Test Kit. *Brucella* FPA, Diachemix LLC, Wisconsin, USA); inconclusive reactors were considered as negative. All samples were also analysed using an iELISA (Ingezim *Brucella* Small Ruminants, Ingenasa, Madrid, Spain) and a bELISA (Ingezim *Brucella* Compac, Ingenasa) according to the manufacturers' instructions. Serum samples from all animals were analysed using ID Screen® *Chlamydia abortus* Indirect ELISA (IDVet, Grabels, France).

Palpebral swabs (recovered after vaccination) and vaginal swabs/milk (taken after reproductive outcome) were cultured in Farrell medium and incubated for at least 8 days at 37°C (in microaerophilia atmospherum, in the case of palpebral samples) according to OIE instructions. Bacteriology was performed on tissue samples from fetus, lambs and ewes after experimental infection in order to determine the presence of challenge strain. Briefly, approximately 2g from each sample were placed in 1.5mL of sterile PBS, macerated and cultured in Farrel selective medium.

All colonies with morphology similar to *Brucella* spp. were suspended in 200µL of sterile water and heat-inactivated at 100°C for 15 minutes. Isolates were identified

as *Brucella* spp. using a specific PCR for *Brucella* genus (Casañas *et al.*, 2001) [in the case of palpebral isolates, colonies were further identified at the species-level using Bruceladder kit (Ingenasa)].

### Statistical analysis.

Proportions of reactors at each test and quantitative results in the different groups from each flock were compared using  $\chi^2$  and analysis of variance (ANOVA) tests at the 0.05 significance level, using the Bonferroni correction for multiple comparisons. Analysis of the data was carried out using software WIN PEPI 4.0 (Abramson, 2004) and SPSS 19 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, New York, USA).

## RESULTS

### Vaccination stage.

Only one sheep from the NV was positive using the serial interpretation of the RBT-CFT at 150 d.p.v. (this animal was also a bELISA and iELISA reactor) (Table 1). No reactors were detected using the FPA (Table 2). However, at least one reactor was detected using ELISA techniques (especially iELISA) along the study in this experimental group (Tables 3-4). In the vaccinated animals, Rev. 1 was isolated from conjunctival swabs from only two animals of the CJg at 7 d.p.v.

Proportion of reactors in all vaccinated groups and the NVg using RBT-CFT, FPA, bELISA and iELISA is summarized in Tables 1-4. The overall proportion of reactors in the CJg peaked at 14 d.p.v. using RBT-CFT (33/68; 48.5%), FPA (15/61; 24.6%) and bELISA (52/67; 77.6%) although a significantly ( $p < 0.05$ ) higher proportion of RBT-CFT and FPA reactors were detected in animals from flock 3 compared with flock 1 and 2 (Table 1 and 2). Afterwards, the number of reactors decreased using these three techniques until 285 d.p.v. (when 20% of the animals were still positive in the bELISA but no reactors were found using RBT-CFT/FPA).

In the SCg, the number of reactors peaked at 14 d.p.v. (62/64, 96.9% RBT-CFT, 28/62, 45.2% FPA and 63/64, 98.4% bELISA). This vaccinated group showed

higher proportion of seropositive animals than the CJg and IDg until 30 (using FPA) and 60 d.p.v. (using RBT-CFT and bELISA). From these sampling points onwards the IDg showed the highest overall number of reactors using these techniques until the end of the monitoring period (285 d.p.v.), in which the proportion of reactors was 38.8% RBT-CFT (19/49), 30.6% FPA (15/49) and 77.6% bELISA (38/49). However, occasional differences were observed in this trend at some sampling days in flock 2 and 3, with flock 3 showing the highest number of bELISA reactors during all monitoring period in the three vaccination groups. Quantitative results from the CFT indicated an even larger difference between duration of the immune response induced in ID-vaccinated animals compared to the SC group, with significantly ( $P < 0.05$ ) higher mean antibody titres in the former group from 60 d.p.v. onwards (data not shown). In addition, quantitative results of the bELISA were also higher in the IDg than those observed in CJg and SCg since days 60 and 90 dpv, respectively onwards (data not shown).

The proportion of reactors detected by the iELISA followed a different trend compared with that observed using the other diagnostics techniques: the highest overall percentages of reactors using this technique was found only after 60-90 dpv in all three groups (Table 3), the proportion of reactors and quantitative results did not decrease significantly in the second part of the study (data not shown) and the percentage of reactors found in the SCg and IDg were comparable (or higher in the former group) throughout the study (Table 3).

### **Challenge stage.**

Abortion occurred in all non-immunized sheep (except one animal which was non pregnant) between 24 and 39 days after the experimental infection (median time=31 days, IQR=27.25-35.25), in days 114-129 of pregnancy, approximately.

Among vaccinated animals, a total of six ewes were non pregnant, four died before they gave birth and in twelve cases an unequivocal relationship between a fetus and its mother could not be established. Two ewes gave birth to a healthy lamb and an abortion and were considered as suffering a reproductive failure. Thus, analysis of the remaining 50 animals (15 CJg, 16 SCg and 19 IDg) are presented.

An overall proportion of 78% of the vaccinated animals (39/50) showed a reproductive failure between 22 and 64 days post-challenge (median=35.11 days, IQR=26.75-41), in days 112-154 of pregnancy, approximately. Deliveries took place between 48 and 55 days (median=50.70, IQR=49.5-52.25) post-challenge, in days 138-145 of gestation, approximately. No significant differences (Chi-Square Test,  $P>0.05$ ) were observed between the proportion of abortions in the CJg (13/15, 86.7%), SCg (11/16, 68.8%) and IDg (15/19, 78.9%), although significant differences were observed between vaccinated and non-vaccinated animals (Fisher's Exact Test,  $P=0.05$ ). A similar proportion of twin/triplet pregnancy in the non-vaccinated (4/14, 28.6%) and vaccinated groups (18/50, 36%) was observed. However, among vaccinated animals the proportion of abortions in animals with twin gestation (17/18) was significantly ( $P=0.03$ ) higher than that observed in ewes with single gestation (22/32) (Risk Ratio= 1.37, 95% confidence interval= 1.06-1.78).

*Brucella* spp. was recovered from all fetus from NV animals. In the vaccinated groups, the overall proportion of *Brucella* positive abortions (considered positive if the bacteria was recovered from at least one fetus in case of twins/triplets; three of them were not suitable for bacteriology) was 86.48% (32/37), [CJg= 66.66% (8/12), SCg= 90.1% (10/11) and in IDg= 100% (14/14)]. However, *Brucella* was not isolated from any of the viable born lambs from previously vaccinated ewes ( $n=10$ , no samples for bacteriology were available for one lamb). *Brucella* spp. was isolated from milk samples in 16 of the 19 (84.21%) studied ewes within the following 7 days after abortion. In the vaccinated animals, proportion of *Brucella* positive-vaginal swabs was significantly higher (Fisher's Exact Test,  $P< 0.05$ ) in ewes which had an abortion (72.72%, 26/36; samples from three animals were no available for bacteriology) compared with animals with a normal parturition (3/11, 27.3%).

The serological response after the challenge was detected earlier in vaccinated animals (with 17/47 RBT, 12/47 CFT; 35/47 bELISA, 39/47 iELISA and 15/47 FPA reactors 7 days after infection; three samples could not be tested due to hemolysis) than in NV sheep (only 2/14 bELISA reactors) (Figure 1). However, from 21 and 28 days onwards the control group showed a higher proportion of RBT/FPA and CFT reactors, respectively, compared with that observed in vaccinated animals that had a reproductive failure (Figure 1). All animals were positive in the bELISA and



iELISA techniques from 14 and 28 days after challenge, respectively, and the RBT was the only technique not able to detect the 100% of vaccinated animals which had an abortion in some point of the monitoring period. In vaccinated animals which had an abortion at 14 days after challenge, the number of RBT reactors (35/39; 89.7% RBT) was lower than those observed using the other serological techniques (38/39, 97.4% CFT and FPA; 39/39; 38/39, 100% bELISA and iELISA), and a similar trend was observed throughout the whole study. The percentage of seropositive animals at 7 d.p.i. was lower in vaccinated animals which had an abortion (17/38, 44.7% RBT; 12/38, 30.8% CFT; 29/38, 76.3% bELISA; 33/38, 86.8% iELISA; 14/38, 36.8% FPA) than in those which had a normal parturition (0/9, 0% RBT; 0/9, 0% CFT; 6/9, 66.7% bELISA; 6/9, 66.7% iELISA; 1/9, 11.1% FPA) (four serum samples could not be tested due to hemolysis). Afterwards, this trend was also maintained along the study. Approximately 50% of animals were seropositive to *Chlamydia abortus* ELISA.

## DISCUSSION

ID Rev. 1 vaccination did not induce detectable local or general reactions, in agreement with what has been previously described in cattle using *B. abortus* 104-M (Lim, 1988). The serological response induced by Rev. 1 vaccination using this route was fast (peaking at 14 d.p.v.), generalised (up to 79.4% of animals being positive at RBT-CFT in a single sampling), strong (as demonstrated by the higher CFT, bELISA and iELISA quantitative results) and long-lasting (36 months after vaccination, three animals from the IDg in flock 3 were still reactors at RBT-CFT, data not shown). These results are in contrast with a previous study showing a faster decrease in the immune response of ID vaccinated cattle compared to the classical SC route (Cotton, 1953).

The serological response of 3-6 months aged lambs observed after vaccination by the CJ route was the weakest during all monitoring period compared with that observed in SCg and IDg serological response) as previously reported (Fensterbank *et al.*, 1982a; Fensterbank *et al.*, 1985; Jiménez de Bagues *et al.*, 1989). The SCg showed the highest proportion of seropositive animals within the first month p.v., in agreement with previous reports that described this route as more immunogenic (Fensterbank *et al.*, 1982a; Fensterbank *et al.*, 1985; Jiménez de Bagues *et al.*, 1989) but the percentage of positive animals in the RBT-CFT was higher in the ID group from 60 d.p.v. until 285 d.p.v (Table 1), suggesting an even higher immunogenic capacity of the ID route.

Our results also showed the diagnostic specificity of the serial interpretation of RBT-CFT in CJ-vaccinated animals, while up to 5.6% (3/54) and 38.8% (19/49) of the SC and ID groups respectively were still positive at both RBT-CFT 10 months post-vaccination, what represents a potential diagnostic problem if these animals are included in a regular testing scheme. The FPA showed an adequate specificity, comparable to that of RBT-CFT, in agreement with previous reports suggesting that this technique may be a good alternative confirmatory test in vaccinated small ruminants (Ramírez-Pfeiffer *et al.*, 2008a). Interestingly the iELISA showed a totally different antibody profile, yielding a low agreement with all other tests. In fact, the large proportion of reactors detected even 10 month after vaccination among all vaccinated sheep (110/153; 71.9%) suggests that the generalized use of this test in young vaccinated sheep may lead to the detection of a non-negligible percentage of reactors due to vaccine antibodies. This 'delayed serological response' observed in the iELISA could be partially explained by a higher affinity of the conjugate used to the immunoglobulin of IgG class typically produced later in the serological response, as previously reported (Stournara *et al.*, 2007). The percentage of reactors detected by the bELISA followed a pattern to that described for RBT-CFT/FPA but with an overall lower specificity (20-77.6% of animals were positive to this technique at the end of the monitoring period).

Although the serological profiles observed using different serological tests in the three flocks were similar, a higher proportion of vaccinated reactors was observed in most of the samplings performed in flock 3 (Table 1-4). All adult animals (>18 months) in this flock are regularly tested for brucellosis and no evidence of infection has been detected in this flock in the last 15 years, ruling out the presence of the disease in the flock. Therefore, some other cross-reacting antigen such as *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O:157 (Corbel, 1985b; Nielsen *et al.*, 2004b) that have similar O-polysaccharide of the LPS might be the cause of these results.

Given the high immunogenicity of the ID route the second part of the study aimed at the evaluation of the protection conferred by Rev. 1 vaccination. Unexpectedly, reproductive failures were observed in more than 70% of the vaccinated animals. The proportion of *Brucella* isolates recovered from foetus and vaginal/milk samples from these vaccinated animals demonstrated that the challenge

strain was the cause of the observed reproductive failures. Previous studies performed following a similar design (Bosseray, 1992) but using animals from experimental flocks instead of animals reared under field conditions have demonstrated the efficacy of Rev. 1 both in young (Fensterbank *et al.*, 1982a; Fensterbank *et al.*, 1985) and adults (Durán-Ferrer *et al.*, 2004) animals. These findings, corroborated by the successful implementation of Rev. 1 vaccination control program in small ruminants, especially in regions where the disease is endemic (Alton and Elberg, 1967; Elberg, 1981; Elberg, 1996; FAO, 2009; World Health Organisation, Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Organization for Animal Health, 2006) demonstrate the usefulness of this vaccine in the field making the Rev. 1 strain the reference vaccine to immunise sheep and goats at risk of infection by *B. melitensis* (OIE, 2009b).

Although the immunogenicity Rev. 1 ID vaccination was confirmed by the serological response induced after immunization, the lack of protection conferred in a large proportion of vaccinated animals makes difficult to draw conclusions from the efficacy of ID Rev. 1 immunization against SRB.

Several factors [such as the high susceptibility to *B. melitensis* of dairy breeds, the high proportion of twin gestations, immunosuppression linked to transport before challenge and possible exposition to other abortifacient pathogens (*C. abortus*)] may play a role in the consequences of challenge observed here. Further specific studies to assess the impact of these (and probably other not considered) factors should be carried out in order to clarify the relevance of these observations.

**TABLE 1.** Percentage of seropositive animals in the serial interpretation of Rose Bengal Test (RBT and the Complement Fixation Test (CFT) during a monitoring study period of 10 months after Rev. 1 vaccination of 3-6 month old ewes using the conjunctival (CJ, n=68), subcutaneous (SC, n=64) and intradermal (ID, n=64) routes. Different superscripts denote significant ( $p < 0.05$ ) differences between groups not sharing the same superscript.

| Farm   | Experimental Group (n) | Sampling day       |                    |                     |                   |                     |                     |                     |                     |                   |
|--------|------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
|        |                        | 7 dpv              | 14 dpv             | 30 dpv              | 60 dpv            | 90 dpv              | 120 dpv             | 150 dpv             | 180 dpv             | 285 dpv*          |
| Farm 1 | NV (19)                | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0                 |
|        | CJ (19)                | 0 <sup>a</sup>     | 15.8 <sup>a</sup>  | 36.8 <sup>b</sup>   | 10.5 <sup>a</sup> | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0                 |
|        | SC (19)                | 68.4 <sup>b</sup>  | 100.0 <sup>b</sup> | 88.9 <sup>c</sup>   | 68.4 <sup>b</sup> | 52.6 <sup>b</sup>   | 36.8 <sup>b</sup>   | 10.5 <sup>a,b</sup> | 10.5 <sup>a,b</sup> | 10.0              |
|        | ID (25)                | 64.0 <sup>b</sup>  | 76.0 <sup>c</sup>  | 60.0 <sup>b,c</sup> | 58.3 <sup>b</sup> | 52.0 <sup>b</sup>   | 40.0 <sup>b</sup>   | 24.0 <sup>b</sup>   | 25.0 <sup>b</sup>   | 27.3              |
| Farm 2 | NV (8)                 | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 12.5                | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    |
|        | CJ (28)                | 0 <sup>a</sup>     | 35.7 <sup>b</sup>  | 25.0 <sup>a</sup>   | 7.1 <sup>a</sup>  | 3.6 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 7.1                 | 3.7 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    |
|        | SC (30)                | 86.2 <sup>b</sup>  | 93.3 <sup>c</sup>  | 86.7 <sup>b</sup>   | 60.0 <sup>b</sup> | 33.3 <sup>b,c</sup> | 33.3 <sup>b,c</sup> | 20.0                | 10.0 <sup>a</sup>   | 6.7 <sup>a</sup>  |
|        | ID (19)                | 57.9 <sup>c</sup>  | 66.7 <sup>d</sup>  | 68.4 <sup>b</sup>   | 61.1 <sup>b</sup> | 55.6 <sup>c</sup>   | 55.6 <sup>c</sup>   | 16.7                | 38.9 <sup>b</sup>   | 33.3 <sup>b</sup> |
| Farm 3 | NV (21)                | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    |
|        | CJ (21)                | 0 <sup>a</sup>     | 95.2 <sup>b</sup>  | 42.9 <sup>b</sup>   | 14.3 <sup>a</sup> | 5.3 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 4.8 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    |
|        | SC (15)                | 100.0 <sup>b</sup> | 100.0 <sup>b</sup> | 80.0 <sup>c</sup>   | 60.0 <sup>b</sup> | 35.7 <sup>b</sup>   | 40.0 <sup>b</sup>   | 26.7 <sup>b</sup>   | 28.6 <sup>b</sup>   | 0 <sup>a</sup>    |
|        | ID (20)                | 90.0 <sup>b</sup>  | 95.0 <sup>b</sup>  | 90.0 <sup>c</sup>   | 90.0 <sup>c</sup> | 73.7 <sup>c</sup>   | 60.0 <sup>b</sup>   | 65.0 <sup>c</sup>   | 55.0 <sup>b</sup>   | 50.0 <sup>b</sup> |
| Total  | NV (48)                | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 2.1 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    |
|        | CJ (68)                | 0 <sup>a</sup>     | 48.5 <sup>b</sup>  | 33.8 <sup>b</sup>   | 10.3 <sup>a</sup> | 3.0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 2.9 <sup>a</sup>    | 3.0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    |
|        | SC (64)                | 84.1 <sup>b</sup>  | 96.9 <sup>c</sup>  | 85.7 <sup>c</sup>   | 62.5 <sup>b</sup> | 39.7 <sup>b</sup>   | 35.9 <sup>b</sup>   | 18.8 <sup>b</sup>   | 14.3 <sup>b</sup>   | 5.6 <sup>a</sup>  |
|        | ID (64)                | 70.3 <sup>b</sup>  | 79.4 <sup>d</sup>  | 71.9 <sup>c</sup>   | 69.4 <sup>b</sup> | 59.7 <sup>c</sup>   | 50.8 <sup>b</sup>   | 34.9 <sup>c</sup>   | 38.7 <sup>c</sup>   | 38.8 <sup>b</sup> |

\* Only a subset of animals ( $n = 153$ : CJ = 50; ID = 49; SC = 54) were sampled at 285 d.p.v.

**TABLE 2.** Percentage of seropositive animals in the serial interpretation of Fluorescence Polarization Assay (FPA) during a monitoring study period of 10 months after Rev. 1 vaccination of 3-6 month old ewes using the conjunctival (CJ, n=68), subcutaneous (SC, n=64) and intradermal (ID, n=64) routes. Different superscripts denote significant ( $p < 0.05$ ) differences between groups not sharing the same superscript.

| Farm   | Experimental Group (n) | Sampling day      |                     |                   |                   |                     |                   |                     |                     |                     |
|--------|------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|        |                        | 7 dpv             | 14 dpv              | 30 dpv            | 60 dpv            | 90 dpv              | 120 dpv           | 150 dpv             | 180 dpv             | 285 dpv*            |
| Farm 1 | NV (19)                | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0                   |
|        | CJ (19)                | 0 <sup>a</sup>    | 5.6 <sup>a</sup>    | 10.5 <sup>a</sup> | 15.8 <sup>a</sup> | 5.3 <sup>a</sup>    | 5.3 <sup>a</sup>  | 5.3 <sup>a,b</sup>  | 0 <sup>a</sup>      | 0                   |
|        | SC (19)                | 10.5 <sup>a</sup> | 38.9 <sup>b</sup>   | 50.0 <sup>b</sup> | 57.9 <sup>b</sup> | 42.1 <sup>b</sup>   | 36.8 <sup>b</sup> | 10.5 <sup>a,b</sup> | 5.3 <sup>a,b</sup>  | 10.0                |
|        | ID (25)                | 4.2 <sup>a</sup>  | 50.0 <sup>b</sup>   | 45.8 <sup>b</sup> | 58.3 <sup>b</sup> | 40.0 <sup>b</sup>   | 36.0 <sup>b</sup> | 20.0 <sup>b</sup>   | 20.8 <sup>b</sup>   | 18.2                |
| Farm 2 | NV (8)                 | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0                 | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0                   | 0                   | 0                   |
|        | CJ (28)                | 0 <sup>a</sup>    | 17 <sup>a</sup>     | 14.3              | 3.6 <sup>a</sup>  | 3.6 <sup>a</sup>    | 3.6 <sup>a</sup>  | 3.6                 | 4.0                 | 0                   |
|        | SC (30)                | 18.5 <sup>a</sup> | 44.8 <sup>b</sup>   | 20.0              | 36.7 <sup>b</sup> | 20.0 <sup>a,b</sup> | 26.7 <sup>b</sup> | 20.0                | 14.3                | 16.7                |
|        | ID (19)                | 26.3 <sup>a</sup> | 17.6 <sup>a,b</sup> | 21.1              | 33.3 <sup>b</sup> | 33.3 <sup>b</sup>   | 27.8 <sup>b</sup> | 16.7                | 23.5                | 22.2                |
| Farm 3 | NV (21)                | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      |
|        | CJ (21)                | 0 <sup>a</sup>    | 50.0 <sup>b</sup>   | 25.0 <sup>b</sup> | 28.6 <sup>b</sup> | 0 <sup>a</sup>      | 4.8 <sup>a</sup>  | 0 <sup>a</sup>      | 4.8 <sup>a,b</sup>  | 0 <sup>a</sup>      |
|        | SC (15)                | 33.3 <sup>b</sup> | 53.3 <sup>b</sup>   | 33.3 <sup>b</sup> | 40.0 <sup>b</sup> | 28.6 <sup>b</sup>   | 13.3 <sup>a</sup> | 13.3 <sup>a</sup>   | 21.4 <sup>b,c</sup> | 14.3 <sup>a,b</sup> |
|        | ID (20)                | 55.0 <sup>b</sup> | 60.0 <sup>b</sup>   | 55.0 <sup>b</sup> | 75.0 <sup>c</sup> | 63.2 <sup>c</sup>   | 45.0 <sup>b</sup> | 45.0 <sup>b</sup>   | 45.0 <sup>c</sup>   | 45.0 <sup>b</sup>   |
| Total  | NV (48)                | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      |
|        | CJ (68)                | 0 <sup>a</sup>    | 24.6 <sup>b</sup>   | 16.4 <sup>b</sup> | 14.7 <sup>b</sup> | 3.0 <sup>a</sup>    | 4.4 <sup>a</sup>  | 2.9 <sup>a</sup>    | 3.1 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>      |
|        | SC (64)                | 19 <sup>b</sup>   | 45.2 <sup>c</sup>   | 31.7 <sup>c</sup> | 43.8 <sup>c</sup> | 28.6 <sup>b</sup>   | 26.6 <sup>b</sup> | 15.6 <sup>b</sup>   | 13.1 <sup>b</sup>   | 14.8 <sup>b</sup>   |
|        | ID (64)                | 27 <sup>b</sup>   | 43.9 <sup>c</sup>   | 41.3 <sup>c</sup> | 56.5 <sup>c</sup> | 45.2 <sup>b</sup>   | 36.5 <sup>b</sup> | 27 <sup>b</sup>     | 29.5 <sup>c</sup>   | 30.6 <sup>b</sup>   |

\* Only a subset of animals ( $n = 153$ : CJ = 50; ID = 49; SC = 54) were sampled at 285 d.p.v.

**TABLE 3.** Percentage of seropositive animals in the serial interpretation of indirect ELISA (iELISA) during a monitoring study period of 10 months after Rev. 1 vaccination of 3-6 month old ewes using the conjunctival (CJ, n=68), subcutaneous (SC, n=64) and intradermal (ID, n=64) routes. Different superscripts denote significant ( $p < 0.05$ ) differences between groups not sharing the same superscript.

| Farm   | Experimental Group (n) | Sampling day      |                   |                    |                    |                     |                     |                     |                     |                     |
|--------|------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|        |                        | 7 dpv             | 14 dpv            | 30 dpv             | 60 dpv             | 90 dpv              | 120 dpv             | 150 dpv             | 180 dpv             | 285 dpv*            |
| Farm 1 | NV (19)                | 0                 | 0 <sup>a</sup>    | 5.6 <sup>a</sup>   | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      |
|        | CJ (19)                | 0                 | 5.6 <sup>a</sup>  | 78.9 <sup>b</sup>  | 100.0 <sup>b</sup> | 84.2 <sup>b,c</sup> | 52.6 <sup>b</sup>   | 47.4 <sup>b</sup>   | 47.4 <sup>b</sup>   | 33.3 <sup>a,b</sup> |
|        | SC (19)                | 5.3               | 52.6 <sup>b</sup> | 100.0 <sup>c</sup> | 100.0 <sup>b</sup> | 100.0 <sup>c</sup>  | 89.5 <sup>c</sup>   | 78.9 <sup>c</sup>   | 84.2 <sup>c</sup>   | 90.0 <sup>c</sup>   |
|        | ID (25)                | 4.2               | 52.4 <sup>b</sup> | 70.8 <sup>b</sup>  | 79.2 <sup>c</sup>  | 76.0 <sup>b</sup>   | 68.0 <sup>b,c</sup> | 68.0 <sup>b,c</sup> | 66.7 <sup>b,c</sup> | 63.6 <sup>b,c</sup> |
| Farm 2 | NV (8)                 | 0                 | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      | 25.0 <sup>a</sup>   | 0 <sup>a</sup>      | 0 <sup>a</sup>      |
|        | CJ (28)                | 0                 | 11.5 <sup>a</sup> | 85.7 <sup>b</sup>  | 92.9 <sup>b</sup>  | 85.7 <sup>b</sup>   | 42.9 <sup>b</sup>   | 25.0 <sup>a</sup>   | 25.9 <sup>a</sup>   | 25.9 <sup>a</sup>   |
|        | SC (30)                | 10.7              | 73.3 <sup>b</sup> | 90.0 <sup>b</sup>  | 96.7 <sup>b</sup>  | 96.7 <sup>b</sup>   | 83.3 <sup>c</sup>   | 76.7 <sup>b</sup>   | 76.7 <sup>b</sup>   | 73.3 <sup>b</sup>   |
|        | ID (19)                | 10.5              | 66.7 <sup>b</sup> | 84.2 <sup>b</sup>  | 100.0 <sup>b</sup> | 100.0 <sup>b</sup>  | 94.4 <sup>c</sup>   | 77.8 <sup>b</sup>   | 83.3 <sup>b</sup>   | 88.9 <sup>b</sup>   |
| Farm 3 | NV (21)                | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 4.8 <sup>a</sup>   | 4.8 <sup>a</sup>   | 5.3 <sup>a</sup>    | 5.0 <sup>a</sup>    | 5.0 <sup>a</sup>    | 5.0 <sup>a</sup>    | 5.3 <sup>a</sup>    |
|        | CJ (21)                | 0 <sup>a</sup>    | 38.1 <sup>b</sup> | 85.7 <sup>b</sup>  | 100.0 <sup>b</sup> | 94.7 <sup>b</sup>   | 66.7 <sup>b</sup>   | 61.9 <sup>b</sup>   | 66.7 <sup>b</sup>   | 80.0 <sup>b</sup>   |
|        | SC (15)                | 21.4 <sup>b</sup> | 40.0 <sup>b</sup> | 73.3 <sup>b</sup>  | 100.0 <sup>b</sup> | 100.0 <sup>b</sup>  | 86.7 <sup>b,c</sup> | 93.3 <sup>c</sup>   | 85.7 <sup>b</sup>   | 92.9 <sup>b</sup>   |
|        | ID (20)                | 35.0 <sup>b</sup> | 55.0 <sup>b</sup> | 95.0 <sup>b</sup>  | 100.0 <sup>b</sup> | 94.7 <sup>b</sup>   | 95.0 <sup>c</sup>   | 90.0 <sup>c</sup>   | 80.0 <sup>b</sup>   | 95.0 <sup>b</sup>   |
| Total  | NV (48)                | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 4.3 <sup>a</sup>   | 2.1 <sup>a</sup>   | 2.2 <sup>a</sup>    | 2.1 <sup>a</sup>    | 6.4 <sup>a</sup>    | 2.1 <sup>a</sup>    | 3.1 <sup>a</sup>    |
|        | CJ (68)                | 0 <sup>a</sup>    | 18.5 <sup>b</sup> | 83.8 <sup>b</sup>  | 97.1 <sup>b</sup>  | 87.9 <sup>b</sup>   | 52.9 <sup>b</sup>   | 42.6 <sup>b</sup>   | 44.8 <sup>b</sup>   | 48 <sup>b</sup>     |
|        | SC (64)                | 11.5 <sup>b</sup> | 59.4 <sup>c</sup> | 88.9 <sup>b</sup>  | 98.4 <sup>b</sup>  | 98.4 <sup>c</sup>   | 85.9 <sup>c</sup>   | 81.3 <sup>c</sup>   | 81 <sup>c</sup>     | 81.5 <sup>c</sup>   |
|        | ID (64)                | 15.9 <sup>b</sup> | 57.6 <sup>c</sup> | 82.5 <sup>b</sup>  | 91.9 <sup>b</sup>  | 88.7 <sup>b</sup>   | 84.1 <sup>c</sup>   | 77.8 <sup>c</sup>   | 75.8 <sup>c</sup>   | 87.5 <sup>c</sup>   |

\* Only a subset of animals ( $n = 153$ : CJ = 50; ID = 49; SC = 54) were sampled at 285 d.p.v.

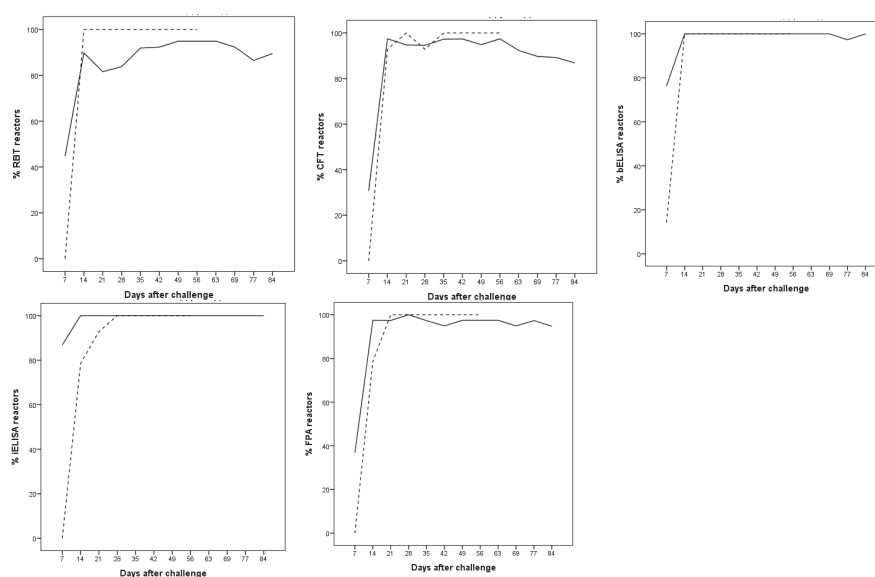
**TABLE 4.** Percentage of seropositive animals in the serial interpretation of blocking ELISA (bELISA) during a monitoring study period of 10 months after Rev. 1 vaccination of 3-6 month old ewes using the conjunctival (CJ, n=68), subcutaneous (SC, n=64) and intradermal (ID, n=64) routes. Different superscripts denote significant ( $p<0.05$ ) differences between groups not sharing the same superscript.

| Farm   | Experimental Group (n) | Sampling day       |                    |                   |                   |                   |                      |                      |                      |                      |
|--------|------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|        |                        | 7 dpv              | 14 dpv             | 30 dpv            | 60 dpv            | 90 dpv            | 120 dpv              | 150 dpv              | 180 dpv              | 285 dpv*             |
| Farm 1 | NV (19)                | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>       | 0 <sup>a</sup>       | 0 <sup>a</sup>       | 0 <sup>a</sup>       |
|        | CJ (19)                | 5.3 <sup>a</sup>   | 42.1 <sup>b</sup>  | 52.6 <sup>b</sup> | 47.4 <sup>b</sup> | 31.6 <sup>b</sup> | 0 <sup>a</sup>       | 10.5 <sup>a</sup>    | 11.1 <sup>a, b</sup> | 33.3 <sup>a, b</sup> |
|        | SC (19)                | 94.7 <sup>b</sup>  | 100.0 <sup>c</sup> | 72.2 <sup>b</sup> | 73.7 <sup>b</sup> | 52.6 <sup>b</sup> | 26.3 <sup>b</sup>    | 47.4 <sup>b</sup>    | 31.6 <sup>b, c</sup> | 40.0 <sup>a, b</sup> |
|        | ID (25)                | 72.0 <sup>b</sup>  | 77.3 <sup>d</sup>  | 64.0 <sup>b</sup> | 70.8 <sup>b</sup> | 56.0 <sup>b</sup> | 40.0 <sup>b</sup>    | 52.0 <sup>b</sup>    | 45.8 <sup>c</sup>    | 54.5 <sup>b</sup>    |
| Farm 2 | NV (8)                 | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>       | 12.5                 | 0 <sup>a</sup>       | 0 <sup>a</sup>       |
|        | CJ (28)                | 0 <sup>a</sup>     | 88.9 <sup>b</sup>  | 42.9 <sup>b</sup> | 25.0 <sup>a</sup> | 14.3 <sup>a</sup> | 0 <sup>a</sup>       | 14.3                 | 11.1 <sup>a</sup>    | 11.1 <sup>a</sup>    |
|        | SC (30)                | 96.7 <sup>b</sup>  | 96.7 <sup>b</sup>  | 63.3 <sup>b</sup> | 66.7 <sup>b</sup> | 50.0 <sup>b</sup> | 30.0 <sup>b, c</sup> | 30.0                 | 30.0 <sup>a, b</sup> | 63.3 <sup>b</sup>    |
|        | ID (19)                | 78.9 <sup>c</sup>  | 83.3 <sup>b</sup>  | 47.4 <sup>b</sup> | 72.2 <sup>b</sup> | 55.6 <sup>b</sup> | 44.4 <sup>c</sup>    | 33.3                 | 50.0 <sup>b</sup>    | 77.8 <sup>b</sup>    |
| Farm 3 | NV (21)                | 16.7 <sup>a</sup>  | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>    | 9.5 <sup>a</sup>  | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>       | 5.0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>       | 5.3 <sup>a</sup>     |
|        | CJ (21)                | 33.3 <sup>a</sup>  | 95.2 <sup>b</sup>  | 75.0 <sup>b</sup> | 90.5 <sup>b</sup> | 36.8 <sup>b</sup> | 14.3 <sup>a, b</sup> | 28.6 <sup>b</sup>    | 33.3 <sup>b</sup>    | 30.0 <sup>b</sup>    |
|        | SC (15)                | 100.0 <sup>b</sup> | 100.0 <sup>b</sup> | 80.0 <sup>b</sup> | 86.7 <sup>b</sup> | 71.4 <sup>c</sup> | 40.0 <sup>b</sup>    | 53.3 <sup>b, c</sup> | 57.1 <sup>b, c</sup> | 78.6 <sup>c</sup>    |
|        | ID (20)                | 100.0 <sup>b</sup> | 95.0 <sup>b</sup>  | 75.0 <sup>b</sup> | 95.0 <sup>b</sup> | 84.2 <sup>c</sup> | 85.0 <sup>c</sup>    | 80.0 <sup>c</sup>    | 70.0 <sup>c</sup>    | 90.0 <sup>c</sup>    |
| Total  | NV (48)                | 6.7 <sup>a</sup>   | 0 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>    | 4.2 <sup>a</sup>  | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>       | 4.3 <sup>a</sup>     | 0 <sup>a</sup>       | 3.1 <sup>a</sup>     |
|        | CJ (68)                | 11.8 <sup>a</sup>  | 77.6 <sup>b</sup>  | 55.2 <sup>b</sup> | 51.5 <sup>b</sup> | 25.8 <sup>b</sup> | 4.4 <sup>a</sup>     | 17.6 <sup>b</sup>    | 18.2 <sup>b</sup>    | 20.0 <sup>b</sup>    |
|        | SC (64)                | 96.8 <sup>b</sup>  | 98.4 <sup>c</sup>  | 69.8 <sup>b</sup> | 73.4 <sup>c</sup> | 55.6 <sup>c</sup> | 31.3 <sup>b</sup>    | 40.6 <sup>c</sup>    | 36.5 <sup>c</sup>    | 63.0 <sup>c</sup>    |
|        | ID (64)                | 82.8 <sup>c</sup>  | 85.0 <sup>b</sup>  | 62.5 <sup>b</sup> | 79.0 <sup>c</sup> | 64.5 <sup>c</sup> | 55.6 <sup>c</sup>    | 55.6 <sup>c</sup>    | 54.8 <sup>d</sup>    | 77.6 <sup>c</sup>    |

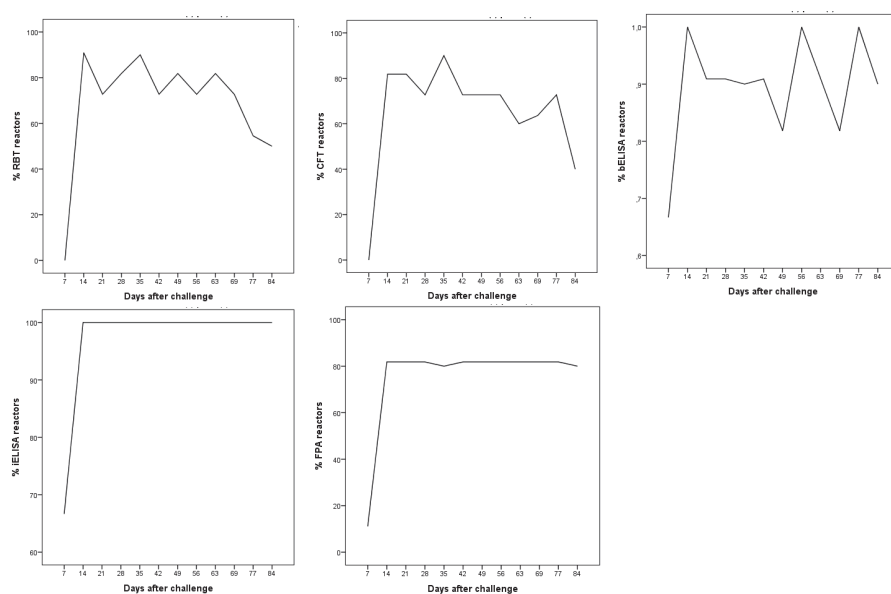
\*Only a subset of animals ( $n = 153$ : CJ = 50; ID = 49; SC = 54) were sampled at 285 d.p.v.

**FIG 1** Percentage of seropositive animals in Rose Bengal Test (RB), Complement Fixation Test (CFT), blocking ELISA (bELISA), indirect ELISA (iELISA) and Fluorescence Polarization Assay (FPA) during a monitoring study period of 42-84 days (for non-vaccinated and vaccinated animals, respectively) after 53H38 *B. melitensis* challenge during midpregnancy of Assaf primiparous sheep. Figures A and B include results from animals which had a reproductive failure or parturition, respectively, after challenge.

A



B





## ESTUDIO 2

G Model

VETIMM-9188; No. of Pages 6

ARTICLE IN PRESS

Veterinary Immunology and Immunopathology xxx (2014) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetimm](http://www.elsevier.com/locate/vetimm)

Short communication

Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains

Marta Pérez-Sancho<sup>a,b</sup>, Manuel Durán-Ferrer<sup>c</sup>, Teresa García-Seco<sup>a,b</sup>,  
Paula Macías<sup>c,d</sup>, Nerea García<sup>a</sup>, Irene Martínez<sup>a</sup>, Elena Ruiz<sup>c</sup>, Emilio Legaz<sup>e</sup>,  
Alberto Díez-Guerrier<sup>b</sup>, Sergio González<sup>a</sup>, Lucas Domínguez<sup>a,b</sup>,  
Julio Álvarez<sup>a,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain<sup>b</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain<sup>c</sup> Laboratorio Central de Sanidad Animal, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Camino del Jau s/n, 18320 Santa Fe, Granada, Spain<sup>d</sup> Sede social Tragsa y Tragsatec, C/Maldonado 58, 28006, Madrid, Spain<sup>e</sup> Castellana de Ganaderos Sociedad Cooperativa, C/Europa 16, 28810 Villalbilla, Madrid, Spain<sup>f</sup> Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 January 2014

Received in revised form 21 March 2014

Accepted 26 March 2014

## Keywords:

IFN- $\gamma$ *Brucella melitensis*

Rev.1

Sheep

Immunology

Cell mediated immune response

## ABSTRACT

Antibody detection is the basis of large-scale sheep brucellosis diagnosis because of its sensitivity and specificity. In contrast, information on the cellular mediated immune (CMI) response triggered after *Brucella melitensis* infection, a cornerstone in the protection against this pathogen, is more limited, particularly regarding the effect of the virulence of the infecting strain in the induced CMI reaction. Here, the interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) profiles evoked after exposure by different routes to virulent (H38) and attenuated (Rev.1) *B. melitensis* strains in 14 pregnant sheep and 87 ewe lambs, respectively, were characterized accounting for different host-related factors, and compared with their serological response and with the basal IFN- $\gamma$  responses observed in 155 animals non exposed to *Brucella*. No significant differences in the IFN- $\gamma$  response of Rev.1 vaccinated animals depending on the inoculation route was observed, in contrast with their serological results. Response in H38-challenged followed a similar trend although peaked later, and an effect of the abortion on the IFN- $\gamma$  response was detected. This information could help to understand the interaction bacteria–host that leads to its intracellular survival and could be useful for the design of new diagnostic approaches.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** LPS, lipopolysaccharide; S-LPS, smooth lipopolysaccharide; RBT, Rose Bengal Test; CFT, Complement Fixation Test; FPA, fluorescence polarization assay; FPSR, false positive serological reactions; CMI, cellular-mediated immune; DIVA, differentiating infected from vaccinated animals; CJ, conjunctival; SC, subcutaneous; ID, intradermal; d.p.i., days post-infection; p.i., post-infection; PC, positive control; NC, negative control; OD<sub>PBS</sub>, OD of whole blood stimulated with PBS; OD<sub>Ag</sub>, OD of whole blood stimulated with S99-antigen; SI, stimulation index; SDTH, skin delayed-type hypersensitivity; d.p.v., days post-vaccination; LTT, lymphocyte transformation test; p.v., post-vaccination; d.p.c., days post-challenge.

\* Corresponding author at: Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, 1365 Gortner Avenue, St. Paul, Minnesota 55108, USA. Tel.: +1 612 624 9458; fax: +1 612 625 7755.

E-mail addresses: [jalvarez@visavet.ucm.es](mailto:jalvarez@visavet.ucm.es), [jalvarez@umn.edu](mailto:jalvarez@umn.edu) (J. Álvarez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.03.014>

0165-2427/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Pérez-Sancho, M., et al., Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. Vet. Immunol. Immunopathol. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.03.014>

## 1. Introduction

The facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*, main etiologic agent of ovine brucellosis, induces a cellular and humoral immune response in sheep. The smooth lipopolysaccharide (S-LPS) of outer membrane of some *Brucella* spp. is a major antigenic factor responsible of the serological response evoked by these zoonotic pathogens after infection (Garrido et al., 2001). The S-LPS-induced response is usually strong, early detectable [as early as 14 days post-exposure (Duran-Ferrer et al., 2004; Fensterbank et al., 1985)] and long-lasting [up to 4 years even when animals are exposed to an attenuated *Brucella* strain (Alton, 1967)] depending on the route of infection, bacterial load and strain, age and physiological status of the host among other factors (Alton, 1987; Fensterbank et al., 1982; Garrido et al., 2001). The serological response has been the basis of nearly all available diagnostic techniques [Rose Bengal Test (RBT), Complement Fixation Test (CFT), ELISA, FPA (OIE, 2009)] for ovine brucellosis diagnosis although some drawbacks [such as a lower sensitivity under certain epidemiological situations (latent carriers, chronically infected animals and newborns from infected females) and the possible occurrence of false positive serological reactions (FPSR) due to the antigenic similarity of the LPS of other Gram negative bacteria, especially *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel, 1985)] have limited its value in the field. In addition, a lack of correlation between the serological responses induced after vaccination and the protection achieved in immunized animals has been observed (Morgan et al., 1966), thus turning serology ineffective to monitor the protection conferred by vaccination.

*Brucella* proteins play a crucial role in the stimulation of the cell-mediated immune (CMI) response in the host (Oliveira et al., 2002) which is a cornerstone of the protection against *Brucella* infection (Stevens et al., 1992). In the CMI response induced after *Brucella* infection, IFN- $\gamma$  [produced mainly by CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD5<sup>+</sup> cells (Suraud et al., 2008)] is a crucial Th1 cytokine (Zhan and Cheers, 1993) which may participate in the clearance of *Brucella* apparently during early phases of infection (Pasquali et al., 2001).

Measurement of the cellular mediated immune response is an alternative already in use for bovine tuberculosis diagnosis, leading to an increase of diagnostic sensitivity in infected settings in the European Union [Council Directive 64/432/EEC]. The potential usefulness of IFN- $\gamma$  determination as an alternative/complementary diagnostic tool for brucellosis has been also evaluated in swine, cattle, and, to a lesser extent, in sheep (Kittelberger et al., 1997; Riber and Jungersen, 2007; Weynants et al., 1995). Although specific IFN- $\gamma$  production in clinical brucellosis has been demonstrated in experimental challenges (Duran-Ferrer et al., 2004), there is a lack of knowledge on the differential IFN- $\gamma$  production induced by the exposure to a field versus attenuated strain (Suraud et al., 2008), what could have implications for eventual DIVA diagnosis. Information regarding IFN- $\gamma$  profile during *Brucella* infection/vaccination in sheep, especially during the clinical phase of the disease (abortion), could be useful

to understand the interaction between the bacteria and the host that leads to its intracellular survival and subsequent reproductive failures (abortions/weak born) and to assess the specificity of the detection of this Th1 cytokine and its potential usefulness for diagnostic purposes.

Here, the basal IFN- $\gamma$  responses observed in non-vaccinated (immunogenically naïve) ewes were determined and compared with those of vaccinated ewes and non-vaccinated animals challenged at approximately 90 days of pregnancy to determine the effect of host (age, physiological status) and pathogen (virulence, dose, route of inoculation)–related factors on the IFN- $\gamma$  production. In addition, the correlation of this Th1 response with specific antibody responses was also evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and experimental design

A total of 155 ewes from three Assaf brucellosis-free flocks (flock 1,  $n=54$ ; flock 2,  $n=52$ ; flock 3,  $n=49$ ) located in Madrid, Spain, were included in the study.

In a first experiment, basal specific IFN- $\gamma$  production was measured in all 155 animals when they were 3–6 months old (day 0). Twenty-five ewes were subsequently sampled 7, 14, 30, 60, 90, 120 and 180 days after the initial sampling to determine specific IFN- $\gamma$  dynamics with age.

In a second experiment, 87 ewes of the initial group were immunized immediately after the initial sampling with  $1-2 \times 10^9$  colony forming units of Rev.1 vaccine strain by different routes [conjunctival (CJ),  $n=30$ ; subcutaneous (SC),  $n=28$  and intradermal (ID),  $n=29$ ]. These animals, included in a study designed to measure the usefulness of the intradermal route for Rev.1 vaccination (Pérez-Sancho et al., unpublished data), were subsequently sampled 7, 14, 30, 60, 90, 120 and 180 days after the initial sampling. Sera and heparinized blood samples were collected from every animal in each sampling day.

In a third experiment 14 non-vaccinated ewes of 13–16 months were challenged conjunctivally with  $5 \times 10^7$  colony forming units of *B. melitensis* strain 53H38 at approximately 90 days of pregnancy. All animals were sampled for whole blood and sera at 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days post-infection (p.i.) and a subset where further sampled at days 49 ( $n=10$ ), 56 ( $n=7$ ) and 63 ( $n=3$ ) p.i.

All husbandry practices and animal procedures were authorized by the scientific and animal experiments committee of Complutense University of Madrid and the animal research committee from the Madrid Region (10/549484.9/09).

### 3. Sample testing

The cell-mediated immune response was assessed by antigen-specific IFN- $\gamma$  detection as described before (Weynants et al., 1995) with slight modifications. Briefly, whole blood samples were transported to the laboratory within the first 6 h post-collection and divided in two aliquots of 1.5 mL. Samples were cultured overnight at 37 °C in a humidified atmosphere after the addition of 15  $\mu$ L of a cell suspension of *B. abortus* S-99 prepared as

Please cite this article in press as: Pérez-Sancho, M., et al., Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. Vet. Immunol. Immunopathol. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.03.014>

G Model

VETIMM-9188; No. of Pages 6

ARTICLE IN PRESS

M. Pérez-Sancho et al. / Veterinary Immunology and Immunopathology xxx (2014) xxx–xxx

3

previously described (Duran-Ferrer et al., 2004) (aliquot 1, in vitro antigen-specific release of IFN- $\gamma$  and PBS (aliquot 2, blank control). Plasma samples were recovered after centrifugation at 490g for 15 min and assayed with the Bovigam ELISA (Prionics) according to the manufacturer's instruction, using the positive (PC) and negative (NC) controls provided in the kit. Different thresholds were used for qualitative interpretation of the results (see below).

Serum samples were analyzed by Rose Bengal Test (RBT) and Complement Fixation Test (CFT) according to the OIE standards (OIEISS, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge) as previously described in Duran-Ferrer et al. (2004).

#### 4. Statistical analysis

Quantitative results (optical densities (OD) after stimulation with PBS ( $OD_{PBS}$ ) and S-99 antigen ( $OD_{ag}$ )) and the stimulation index  $SI = OD_{ag}/OD_{PBS}$  (Weynants et al., 1995) were recorded in an Excel file. Samples showing an abnormally high  $OD_{PBS}$  (higher than the mean  $OD_{PBS}$  obtained in experiment 1 + 3  $\times$  standard deviations (SD),  $OD_{PBS} > 0.16$ ) were excluded from the analysis.

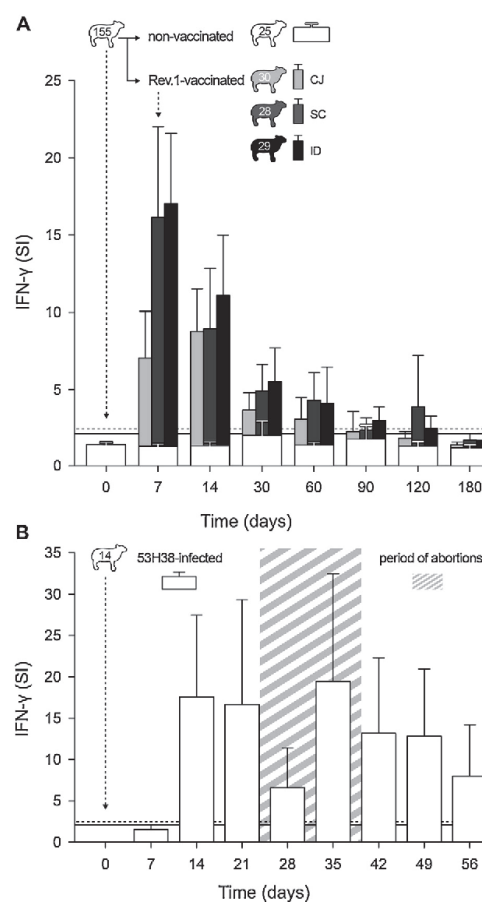
Two thresholds were evaluated for data interpretation, calculated using the values obtained in experiment 1: threshold A, set at the mean  $OD_{ag} + 3 \times SD$  ( $SI \geq 2.5$ ) and threshold B, fixed at the mean  $OD_{ag} + 2 \times SD$  ( $SI \geq 2.1$ ). Data were assessed for normality and differences on quantitative results depending on the age, sampling, flock of origin and vaccination route were evaluated using parametric (analysis of variance, ANOVA) and non-parametric (Spearman correlation coefficient, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests) tests at a 0.05 level of significance. When a  $p$  value below 0.05 in the ANOVA test was found results were further analyzed using the Bonferroni test. Differences in the proportion of positive animals with the two cut-off points evaluated were assessed using the chi-square test, and agreement between results using different thresholds/tests (IFN- $\gamma$  assay and serology) was measured using the Kappa statistic. Possible confounding between independent covariables was also evaluated using multivariable linear and logistic regression models.

Statistical analysis of the data was carried out using software WIN PEPI 4.0 (Abramson, 2004) and SPSS 19 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, New York, USA).

#### 5. Results and discussion

##### 5.1. IFN- $\gamma$ in naïve animals

$OD_{PBS}$  and  $OD_{ag}$  obtained in the 155 ewes sampled at day 0 were not affected by the age at sampling or the farm of origin (Spearman test and ANOVA,  $P > 0.05$ ). However, SI values obtained in ewes at day 0 were significantly lower in animals from herd 3 (ANOVA,  $P = 0.009$ ) while no effect was observed depending on the age. This flock effect remained significant ( $P = 0.026$ ) after adjustment by age in a multivariable analysis. Regarding qualitative interpretation of the test at day 0 the number of reactors did not differ significantly between farms, ranging from 0 to



**Fig. 1.** SI ( $SI = (OD_{ag}/OD_{PBS})$ ) mean values ( $\pm 95\%$  confidence intervals) obtained in 3–6 months old ewes in the following 180 days after Rev1 vaccination by the conjunctival ( $n = 30$ , light grey bars), subcutaneous ( $n = 28$ , dark grey bars) and intradermal ( $n = 29$ , black bars) routes and SI mean values of 14 pregnant 13–16 months aged ewes after challenge with *B. melitensis* 53H38 strain by the conjunctival route [a subset of animals was evaluated at 49 ( $n = 10$ ) and 56 ( $n = 7$ )]. Thresholds A ( $SI \geq 2.5$ ) and B ( $SI \geq 2.1$ ) are indicated by the dotted and solid lines respectively.

4 using threshold A, while threshold B yielded marginally significant ( $P = 0.069$ ) higher number of reactors in herds 1 ( $n = 6$ ) and 2 ( $n = 8$ ) compared to herd 3 ( $n = 1$ ). However, logistic multivariable analysis failed to detect a significant effect of the flock of origin after adjustment by age of the animals.

In the subgroup of 25 non-exposed animals followed longitudinally significant differences on the  $OD_{PBS}$  and/or  $OD_{ag}$  values obtained between two of the first pairs of consecutive samplings (14–30 and 30–60) were observed (Wilcoxon test,  $P < 0.05$ ). However, comparison of the SI values did not reveal significant changes between any pair of consecutive samplings or between day 0 and any other

Please cite this article in press as: Pérez-Sancho, M., et al., Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. Vet. Immunol. Immunopathol. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.03.014>

samplings (Wilcoxon test,  $P > 0.05$ ) (Fig. 1A), suggesting a certain degree of stability of the IFN- $\gamma$  production in animals between 3–6 and 9–12 months. Regardless the threshold in place, the number of reactors at the different samplings (excluding day 0) ranged from 1 to 3 (Fig. 1A), with one ewe being positive in all samplings from day 30 onwards if the cut-off B was used.

Six ewes tested positive in the RBT at different samplings; while no significant differences on the OD<sub>ag</sub> and SI responses were observed (Mann–Whitney test,  $P > 0.1$ ) the OD<sub>pgs</sub> values were significantly lower in the RBT positive animals (Mann–Whitney test,  $P = 0.027$ ). No reactors were detected on the CFT. Considering all analyses performed longitudinally, no significant differences on the number of reactors were observed using RBT (6/316) and SI/threshold A (13/318) although comparison of positive animals to the SI using threshold B (28/318) revealed significant differences ( $p < 0.001$ ) thus highlighting a potential lack of specificity of this cut-off for IFN- $\gamma$  interpretation. Tests based on the CMI response [as the skin delayed-type hypersensitivity (SDTH) test] have been proposed to overcome FPSR caused by the similarity of the LPS of some gram negative bacteria (Blasco et al., 1994; Bercovich et al., 1993). In our study, a number of naïve animals were positive in the IFN- $\gamma$  test (false positive animals) using smooth antigens for in vitro stimulation of whole blood, especially when threshold B was applied. Possible explanations for these false positive reactors using IFN- $\gamma$  include the presence of LPS of *B. abortus* S99 in the antigenic preparation used in the stimulation of whole blood as suggested in bovine (Weynants et al., 1995), and a certain age effect in young animals due to an immature cellular immune system that could lead to large variations in the IFN- $\gamma$  response, as observed previously in paratuberculosis in cattle less than 1 year old (Huda et al., 2003).

### 5.2. IFN- $\gamma$ after Rev.1 vaccination

A strong increase on the SI was observed already 7 d.p.v. regardless vaccination route (Figs. 1A and 2A). However, ID and SC vaccination yielded a higher increase in the SI values immediately after vaccination compared to the CJ group (Fig. 1A), with the latter reaching peak values 14 d.p.v. in agreement with previous studies (Jacques et al., 2007). Once the maximum values were achieved a decreasing trend in the SI was observed in all three vaccinated groups, reaching non-significantly (Wilcoxon test,  $p > 0.05$ ) different values with those found at day 0 at three (CJ group) or six months (ID and SC groups) after vaccination. A previous study also reported a more intense and long lasting SDTH response in cattle vaccinated by the subcutaneous route compared with conjunctivally immunized animals (Saegerman et al., 1999). The ability of the Rev.1 vaccine to trigger a detectable cellular immune response in sheep had been demonstrated by different techniques [lymphocyte transformation test (LTT), production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO by macrophages] in the past (Sinha et al., 2007), although the specific IFN- $\gamma$  production has not been the subject of specific studies aiming at its determination. The effect of the vaccination route on the SI was only significant (Kruskal–Wallis test,  $P = 0.001$ ) on day 7 p.v.,

with lower values in the CJ group. These results are in contrast with the significant effect of the inoculation route on the serological responses of these animals (Pérez-Sancho et al., unpublished data), as a significantly lower proportion of reactors in the CJ group compared with the ID and SC groups was found in the following 3–10 months after the immunization.

Considering all the follow-up, a lower level of agreement between the qualitative results of the RBT and IFN- $\gamma$  (Threshold A) was observed in animals vaccinated by the CJ route (Kappa = 0.24) compared to ID (Kappa = 0.306) and SC (0.331) mainly due to the higher proportion of IFN- $\gamma$  reactors yielding negative results in the serological test in the former group. Lack of detectable serological response in some CJ vaccinated animals (which may be protected against posterior *Brucella* exposure) has been described repeatedly. The absence of statistically significant differences depending on the vaccination route from day 14 p.v. onwards observed here suggests a potential value of the IFN- $\gamma$  measurement after Rev.1 application to assess the success of the immunization during vaccination campaigns regardless route of inoculation. The cellular immune response was detectable earlier than the serological reaction in a significantly ( $P < 0.05$ ) larger proportion of animals independently of the threshold used for IFN- $\gamma$  interpretation [83% and 84.1% for threshold A and B (Fig. 2A) compared to 56.8% using RBT at 7 d.p.v. (Fig. 2B)]. This is in agreement with previous reports suggesting a potential role of IFN- $\gamma$  during early phases of *Brucella* infection (Pasquali et al., 2001). In addition, decrease of the proportion of reactors in the IFN- $\gamma$  assay was faster than that observed for RBT: at 180 d.p.v., only 10.6% (9/85) and 12.9% (11/85) of immunized animals were positive at SI using threshold A and B, respectively; however, 42.4% (36/85) of the vaccinated sheep were still seropositive at that sampling point (Fig. 2A and B). Thus, specific IFN- $\gamma$  detection could be also useful to differentiate FPSR due to vaccination from truly infected animals as previously demonstrated for S19 vaccinated cattle using Lymphocyte-Stimulation Test (Kaneene et al., 1979), although further studies would be necessary to confirm these results.

### 5.3. IFN- $\gamma$ after H38 challenge

The SI index observed 7 days after *B. melitensis* H38 challenge (d.p.i.) was significantly (Kruskal–Wallis test,  $P < 0.05$ ) lower than that observed 7 d.p.v. in vaccinated ewes (Fig. 1), with only three reactors detected using both thresholds. This apparently contradictory effect (lower response when a virulent strain was used) could be due to the differential dose used ( $10^7$  compared to  $10^9$ ) and/or a possible immunosuppression related with pregnancy in challenged animals. Still, a strong increase was observed 14 days post-challenge as previously reported (Duran-Ferrer et al., 2004; Jacques et al., 2007), leading to values comparable to those detected in vaccinated animals (Fig. 1, Kruskal–Wallis test,  $P = 0.33$ ). This 'delayed' response could be related to the route used for infection (CJ) in these sheep, that would lead to a local production of IFN- $\gamma$  at the lymph nodes to control the *Brucella* after inoculation (Suraud et al., 2008). Interestingly, a marginally significant

Please cite this article in press as: Pérez-Sancho, M., et al., Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. Vet. Immunol. Immunopathol. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.03.014>

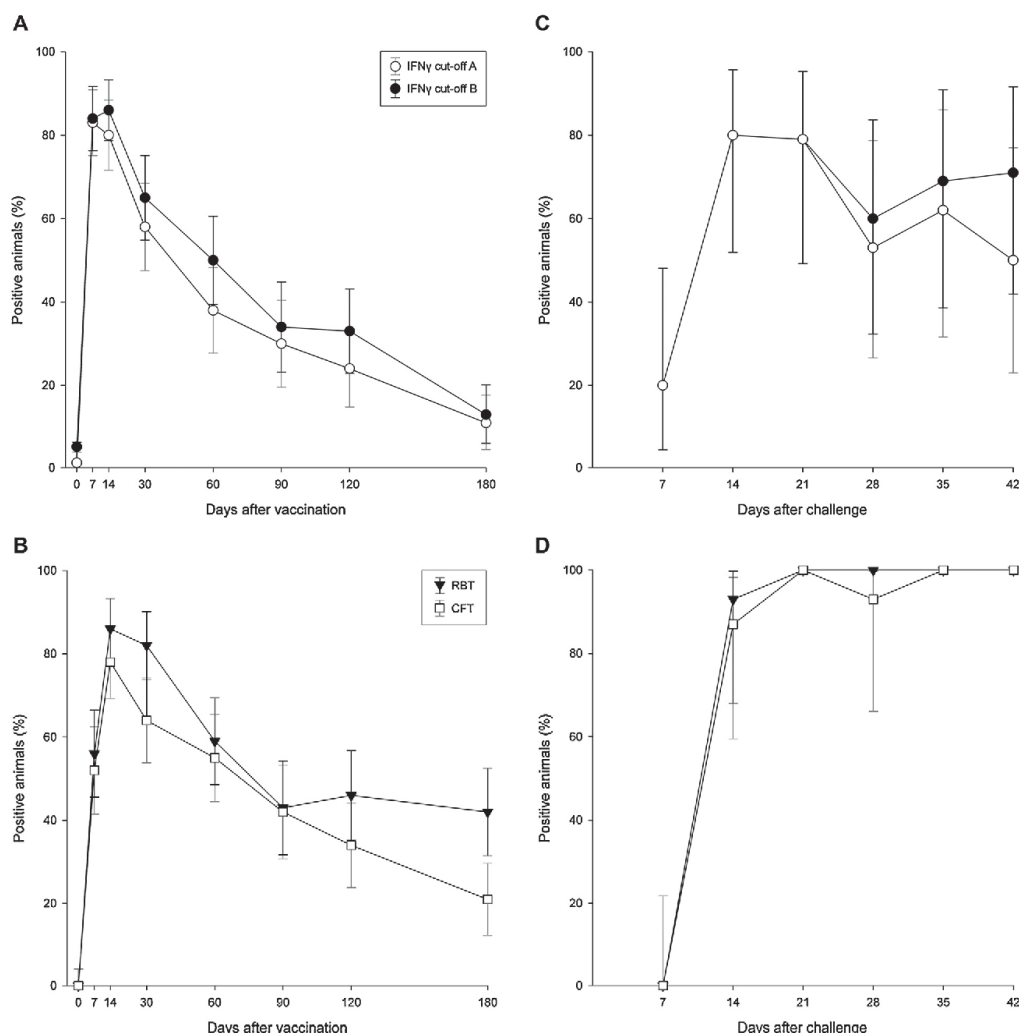
G Model

VETIMM-9188; No. of Pages 6

ARTICLE IN PRESS

M. Pérez-Sancho et al. / Veterinary Immunology and Immunopathology xxx (2014) xxx–xxx

5



**Fig. 2.** Proportion ( $\pm 95\%$  confidence intervals) of Rev1 vaccinated 3–6 months old ewes in the following 180 days after vaccination (A and B) and proportion of 13–16 months old ewes conjunctively challenged with *B. melitensis* 53H38 strain after infection (C and D) which were reactors using Rose Bengal Test (RBT) (B and D), Complement Fixation Test (CFT) (B and D) and IFN- $\gamma$  detection [ $SI = (OD_{490}/OD_{750})$ ; Threshold A  $\geq 2.5$ ; Threshold B  $\geq 2.1$  (A and C)].

(Wilcoxon test,  $P=0.055$ ) decrease of the value of SI in the following two weeks (21 and 28 d.p.c.) was observed, corresponding with the approximate dates of abortion (that occurred between 21 and 35 d.p.c.), (Fig. 1B) in agreement with previous reports (Duran-Ferrer et al., 2004). In fact, only 6/13 animals had SI values above threshold B around the abortion compared with 10–12 ewes 4–20 days before/after abortion (Fig. 2C). This evolution of the IFN- $\gamma$  responses in the pregnant sheep could be related to the dynamics of the infection by *B. melitensis*, which after a first stage of bacteremia colonizes the placenta of the pregnant

ewe while ceasing to circulate in the blood, what could lead to a decrease of the specific IFN- $\gamma$  production by the blood cells. After the abortion a second bacteremia takes place in the infected animal, what could induce the increase in the specific IFN- $\gamma$  response observed here days after the period of abortions.

Interestingly all 14 challenged animals were positive in the RBT and CFT from 14 d.p.c. onwards (except one CFT negative ewe at 28 d.p.c.) (Fig. 2D). IFN- $\gamma$  detected infection earlier than serological tests based on LPS- antibodies (RBT and CFT) in a subset ( $n=3$ ) of animals as previously

Please cite this article in press as: Pérez-Sancho, M., et al., Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. Vet. Immunol. Immunopathol. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.03.014>



G Model

VETIMM-9188; No. of Pages 6

## ARTICLE IN PRESS

6

M. Pérez-Sancho et al. / Veterinary Immunology and Immunopathology xxx (2014) xxx–xxx

reported (Weynants et al., 1995) although IFN- $\gamma$  was not able to detect infection in all challenged animals, in contrast with the RBT and CFT results. Still, combination of IFN- $\gamma$  and CFT/RBT allowed the detection of all challenged animals from day 14 post-challenge until the end of the experiment. Variations on the IFN- $\gamma$  responses observed after challenge are in contrast with the robust and constant serological responses detected by RBT, and could be useful to monitor the evolution of infected animals and predict eventual reproductive failure although further studies would be necessary to elucidate the potential value of IFN- $\gamma$  as indicative factor of clinical brucellosis stage.

### Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

### Acknowledgments

This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (grant number AGL200912674). During the study, Marta Pérez-Sancho was a recipient of a predoctoral grant from Comunidad de Madrid (IV Plan Regional de Investigación Científica e Innovación Tecnológica, 2005–2008) y Fondo Social Europeo.

### References

- Abramson, J.H., 2004. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol. Perspect. Innov.* 1, 6.
- Alton, G.G., 1967. Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. Serological reactions in Maltese goats. *J. Comp. Pathol.* 77, 327–329.
- Alton, G.G., 1987. Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats – a review. *Trop. Anim. Health Prod.* 19, 65–74.
- Bercovich, Z., Haagsma, J., van Lipzig, J.H., Taaijke, R., 1993. Specificity of the skin delayed-type hypersensitivity test in brucellosis free cattle tested with a *Brucella* allergen. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 40, 582–588.
- Blasco, J.M., Marin, C., Jimenez de Bagues, M.P., Barberan, M., Hernandez, A., Molina, L., Velasco, J., Diaz, R., Moriyon, I., 1994. Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1835–1840.
- Corbel, M.J., 1985. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Veter. Bull.* 55, 927.
- Duran-Ferrer, M., Leon, L., Nielsen, K., Caporale, V., Mendoza, J., Osuna, A., Perales, A., Smith, P., De-Frutos, C., Gomez-Martin, B., Lucas, A., Chico, R., Delgado, O.D., Escabias, J.C., Arrogante, L., Diaz-Parra, R., Garrido, F., 2004. Antibody response and antigen-specific gamma-interferon profiles of vaccinated and unvaccinated pregnant sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.* 100, 219–231.
- Fensterbank, R., Pardon, P., Marly, J., 1982. Comparison between subcutaneous and conjunctival route of vaccination with Rev. 1 strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. *Ann. Rech. Vet.* 13, 295–301.
- Fensterbank, R., Pardon, P., Marly, J., 1985. Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. *Ann. Rech. Vet.* 16, 351–356.
- Garrido, F., Duran-Ferrer, M., MacMillan, A., Minas, A., Nicoletti, P., Vechhi, G. Brucellosis in sheep and goats (*B. melitensis*). SANCO.C2/AH/R23/2001, pp. 1–89. 2001. ef.
- Huda, A., Lind, P., Christoffersen, A.B., Jungersen, G., 2003. Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94, 95–103.
- Jacques, I., Verger, J.M., Laroucau, K., Grayon, M., Vizcaino, N., Peix, A., Cortade, F., Carreras, F., Guilloteau, L.A., 2007. Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by bp26 and omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants in sheep. *Vaccine* 25, 794–805.
- Kaneene, J.M., Anderson, R.K., Muscoplat, C.C., Johnson, D.W., 1979. Cell-mediated immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 vaccine and nonexposed control animals of the same age. *Am. J. Vet. Res.* 40, 999–1004.
- Kittelberger, R., Reichel, M.P., Joyce, M.A., Staak, C., 1997. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9, III. Specificity of the in vitro antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis diagnosis in experimentally *Yersinia enterocolitica* O:9-infected cattle. *Vet. Microbiol.* 57, 361–371.
- Morgan, W.J., Littlejohn, A.L., Mackinnon, D.J., Lawson, J.R., 1966. The degree of protection given by living vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in goats. *Bull. World Health Organ.* 34, 33–40.
- OIE, 2009. Caprine and Ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2.7.2.
- Oliveira, S.C., Soeurt, N., Splitter, G., 2002. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.* 90, 417–424.
- Pasquali, P., Adone, R., Gasbarre, L.C., Pistoia, C., Ciuchini, F., 2001. Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infect. Immun.* 69, 6541–6544.
- Riber, U., Jungersen, G., 2007. Cell-mediated immune responses differentiate infections with *Brucella suis* from *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 13–25.
- Saegerman, C., Vo, T.K., De Waele, L., Gilson, D., Bastin, A., Dubray, G., Flanagan, P., Limet, J.N., Letesson, J.J., Godfroid, J., 1999. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Vet. Rec.* 145, 214–218.
- Sinha, D., Singh, D., Bishor, V., Goswami, T., 2007. Cell mediated immune response in sheep vaccinated with *Brucella melitensis* Rev. 1. *Ind. J. Anim. Sci.* 77, 799–803.
- Stevens, M.G., Pugh, G.W.Jr., Tabatabai, L.B., 1992. Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice. *Infect. Immun.* 60, 4407–4409.
- Surraud, V., Jacques, I., Olivier, M., Guilloteau, L.A., 2008. Acute infection by conjunctival route with *Brucella melitensis* induces IgG+ cells and IFN-gamma producing cells in peripheral and mucosal lymph nodes in sheep. *Microbes Infect.* 10, 1370–1378.
- Weynants, V., Godfroid, J., Limbourg, B., Saegerman, C., Letesson, J.J., 1995. Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *J. Clin. Microbiol.* 33, 706–712.
- Zhan, Y., Cheers, C., 1993. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.* 61, 4899–4901.

Please cite this article in press as: Pérez-Sancho, M., et al., Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.03.014>

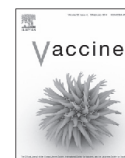
## ESTUDIO 3

Vaccine 32 (2014) 1877–1881



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)

# Evaluation of the immunogenicity and safety of *Brucella melitensis* B115 vaccination in pregnant sheep



Marta Pérez-Sancho<sup>a,b</sup>, Rosanna Adone<sup>c</sup>, Teresa García-Seco<sup>a,b</sup>, Michaela Tarantino<sup>c</sup>,  
 Alberto Díez-Guerrier<sup>b</sup>, Rosanna Drumo<sup>c</sup>, Massimiliano Francia<sup>c</sup>, Lucas Domínguez<sup>a,b</sup>,  
 Paolo Pasquali<sup>c</sup>, Julio Álvarez<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, PC 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, PC 28040, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Unit Prophylaxis and Control of Bacterial Zoonoses, Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, PC 00161 Rome, Italy

<sup>d</sup> Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Ctra. Colmenar Viejo, km. 9.100, PC 28034 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 November 2013

Received in revised form 14 January 2014

Accepted 21 January 2014

Available online 7 February 2014

## Keywords:

*Brucella melitensis*

B115 strain

Vaccination

Sheep

Pregnancy

Safety

## ABSTRACT

In spite of its limitations, Rev.1 is currently recognized as the most suitable vaccine against *Brucella melitensis* (the causative agent of ovine and caprine brucellosis). However, its use is limited to young animals when test-and-slaughter programs are in place because of the occurrence of false positive reactions due to Rev.1 vaccination. The *B. melitensis* B115 rough strain has demonstrated its efficacy against *B. melitensis* virulent strains in the mouse model, but there is a lack of information regarding its potential use in small ruminants for brucellosis control. Here, the safety and immune response elicited by B115 strain inoculation were evaluated in pregnant ewes vaccinated at their midpregnancy. Vaccinated ( $n=8$ ) and non-vaccinated ( $n=3$ ) sheep were periodically sampled and analyzed for the 108 days following inoculations using tests designed for the detection of the response elicited by the B115 strain and routine serological tests for brucellosis [Rose Bengal Test (RBT), Complement Fixation Test (CFT) and blocking ELISA (ELISAb)]. Five out of the 8 vaccinated animals aborted, indicating a significant abortifacient effect of B115 inoculation at midpregnancy. In addition, a smooth strain was recovered from one vaccinated animal, suggesting the occurrence of an in vivo reversion phenomenon. Only one animal was positive in both RBT and CFT simultaneously (91 days after vaccination) confirming the lack of induction of cross-reacting antibody responses interfering with routine brucellosis diagnostic tests in most B115-vaccinated animals.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Ruminants are considered the main source of infection of *Brucella* spp. for humans [1]. *Brucella melitensis*, the main etiologic agent of small ruminant brucellosis (SRB), is endemic in most Mediterranean countries, Latin America, Middle East and Central Asia [2] and it is recognized as the most important causative agent of human brucellosis in most parts of the world [3]. In nearly all developed countries in which the disease was present, the

control/eradication of SRB has been achieved through three main strategies: hygienic measures, test-and-slaughter policy and/or Rev.1 vaccination. *B. melitensis* Rev.1 [4] has been widely recognized as the best vaccine against *B. melitensis* currently available for small ruminants, and many studies have demonstrated its usefulness in different conditions [5–8]. However, certain drawbacks linked to the smooth nature of Rev.1 have limited its application in the field as occurs with *Brucella abortus* S19 vaccine in cattle. The use of Rev.1 is usually restricted to prepuberal ewes and goats due to its residual virulence (that may lead to abortion in pregnant animals [9] and disease in humans [10]) and the induction of diagnostic interferences on the serological tests used for diagnosis of SRB (due to the elicitation of anti-S-LPS antibodies) [11]. In the case of bovine brucellosis the RB51 strain (a *B. abortus* rough strain) is an alternative to S19 vaccination that may overcome at least in part some of these drawbacks, and whose use has proved successful in several countries worldwide including Portugal, Spain and Argentina [12–14]. However, the protection induced by RB51 in

\* Corresponding author at: Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Ctra. Colmenar Viejo, km. 9.100, 28034 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3944096.

E-mail addresses: [maperezs@visavet.ucm.es](mailto:maperezs@visavet.ucm.es) (M. Pérez-Sancho), [rosanna.adone@iss.it](mailto:rosanna.adone@iss.it) (R. Adone), [teresagrs@visavet.ucm.es](mailto:teresagrs@visavet.ucm.es) (T. García-Seco), [michela.tarantino@iss.it](mailto:michela.tarantino@iss.it) (M. Tarantino), [aadguerrier@vet.ucm.es](mailto:aadguerrier@vet.ucm.es) (A. Díez-Guerrier), [rosanna.drumo@guest.iss.it](mailto:rosanna.drumo@guest.iss.it) (R. Drumo), [massimiliano.francia@iss.it](mailto:massimiliano.francia@iss.it) (M. Francia), [lucasdo@visavet.ucm.es](mailto:lucasdo@visavet.ucm.es) (L. Domínguez), [paolo.pasquali@iss.it](mailto:paolo.pasquali@iss.it) (P. Pasquali), [jvalvarez@visavet.ucm.es](mailto:jvalvarez@visavet.ucm.es), [jvalvarezvet@gmail.com](mailto:jvalvarezvet@gmail.com) (J. Álvarez).

pregnant sheep against *B. melitensis* is very limited compared to that evoked by the Rev.1 vaccine [15]. *Brucella melitensis* B115 strain (herein after B115), a natural rough stable strain [16], has demonstrated its usefulness for the immunization not only against *B. melitensis*, but also against *B. abortus* and *B. ovis* in the mouse model [17,18]. However, only one study from 1960 assessed its efficacy compared to Rev.1 in non-pregnant goats [19], although the use of animals in poor conditions make difficult the extrapolation of the results obtained. Considering these promising results and the lack of an alternative to the Rev.1 vaccine for the immunization against *B. melitensis* in small ruminants, the present study was carried out aiming to (i) assess the safety of B115 strain in pregnant ewes vaccinated at midpregnancy (around 90 days of pregnancy), (ii) evaluate the risk in vaccinated animals of B115-shedding, that could lead to horizontal transmission and (iii) assess the serological and cellular immune response induced in vaccinated and non-vaccinated animals using tests designed for the detection of the response elicited by the B115 strain and routine serological tests for SRB [Rose Bengal Test (RBT), Complement Fixation Test (CFT) and blocking ELISA (ELISAb)].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental design and vaccination

Eleven Manchega-breed ewes aged approximately 12 months from an officially brucellosis free flock [according to European (91/68/EEC) and national regulations (Spanish Royal Decree 1047/2003)] were randomly selected. All ewes were seronegative for brucellosis and other abortifacient infectious diseases (Q fever, toxoplasmosis, chlamydiosis, visna-maedi, and border disease). They were mated after oestrus synchronization and randomly divided into two experimental groups: (i) vaccinated group (VG;  $n=8$ ) and (ii) control animals (non-vaccinated group, NVG;  $n=3$ ). All animals were kept together in the same isolated pen with food and water provided ad libitum. The VG was vaccinated subcutaneously in the axillary region with  $1-2 \times 10^9$  CFU of B115 in a volume of 1 mL in the last third of pregnancy (around 90 days of gestation). Previously, the freeze-dried B115 vials were reconstituted in 7.6 mL of sterile saline solution before inoculation. The B115 viable bacteria concentration of each vial used in the present study was verified by counting plate on the day of vaccination. All husbandry practice and animal procedures were authorized by the animal research committee from Madrid Region (10/230335.9/11).

### 2.2. Sampling

The B115 bacteremia in all animals was monitored at 3, 7, 14 and 28 days post-vaccination as well as the day of abortion/parturition and 7, 14 and 21 days after the reproductive outcome. Sera samples from each animal (VG and NVG) were collected at 0 and 3 days post-vaccination (d.p.v.), and thereafter weekly until slaughter (108 d.p.v.). Whole blood for specific interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) detection was taken from all animals on the day of vaccination (day 0; before immunization) and 7, 14, 28 and 63 days post-vaccination (d.p.v.) Thereafter, whole blood samples were collected weekly until 99 days post-vaccination. Milk and vaginal swabs were collected from all animals the day of parturition/abortion and 7, 14 and 21 days after the reproductive event. A subset of animals was also sampled for milk ( $n=5$ ) and vaginal swabs ( $n=6$ ) at 28 and 35 days, respectively, after parturition/abortion. Samples from spleen, lung, liver and/or stomach content were collected from fetuses and subjected to bacteriological analysis on the same day or refrigerated at 4 °C and processed the following day. Similarly, samples from

all ewes (liver and mammary lymph nodes) and viable lambs (liver and spleen) were collected at the end of the experiment (108 days post-vaccination and 4–6 weeks after abortion/parturition). These samples were stored at  $-20$  °C until further analysis.

### 2.3. Serology

Serum samples were subjected to classical brucellosis serological tests based on smooth LPS antigens of *Brucella* [RBT, CFT and ELISAb]. RBT and CFT were carried out according to Alton et al. [20]. The Blocking ELISA (INGEZIM BRUCELLA COMPAC, Ingenasa, Tres Cantos, Spain) was performed according to manufacturer instructions. A specific B115-CFT based on the detection of antibodies against B115-rough antigen was performed as previously described by Adone et al. [21].

### 2.4. Cell mediated immune response

Whole blood samples were analyzed to determine the specific IFN- $\gamma$  production after in vitro antigen stimulation as previously described by Duran-Ferrer et al. [29] with slight modifications. Whole blood was processed within the first 6 h after collection. Each blood sample was divided into three aliquots of 1 mL: aliquot 1 was stimulated with 10  $\mu$ L of a cell suspension of *B. abortus* S99 prepared for complement fixation test antigen [20] but 10 times more concentrated, aliquot 2 was inoculated with 40  $\mu$ L of Brucellergen (Symbiotics OCB) and aliquot 3 was stimulated with 50  $\mu$ L of PBS (Phosphate Buffered Saline). All samples were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere for  $20 \pm 2$  h and plasma was then recovered after centrifugation at 490 g for 15 min. All samples were stored at  $-40$  °C until being analyzed with the Bovigam ELISA (Prionics, Schlieren-Zurich, Switzerland) according to the manufacturer instruction. Quantitative results [ODs after stimulation with PBS ( $OD_{PBS}$ ), S99 antigen ( $OD_{S99}$ ) and B115 antigen ( $OD_{B115}$ )] and the stimulation index  $SI = OD_{ag}/OD_{PBS}$  [22] were recorded in an Excel file. The threshold (considering animals positive if  $SI \geq 2.5$ ) previously described [22] was used.

### 2.5. Bacteriology and molecular analysis

Bacteriology was performed according to the OIE guidelines [23] and Alton et al. [20]. Briefly, approximately 2 g from each sample was placed in 1.5 mL of sterile PBS, macerated and cultured in Farrel selective medium. Plates were incubated at 37 °C for at least 14 days. Milk and vaginal swabs were directly cultured in Farrel medium. A subset of milk samples ( $n=30$ ) were centrifuged at  $490 \times g$  for 28 min. Milk swabs recovered from the upper layer after centrifugation were directly plated in Farrel medium. Finally, a total of 10 mL of whole blood was seeded in a biphasic Castañeda medium and incubated at 37 °C at least 30 days.

All *Brucella*-like colonies were suspended in 200  $\mu$ L of sterile water and heat-inactivated at 100 °C for 15 min. Molecular identification was performed by a *Brucella*-genus specific PCR [24]. Phenotype (rough or smooth) of all *Brucella* isolates was assessed by crystal violet dye and Acriflavine test according to Alton et al. [20]. PCR and sequencing analysis of gene *wzm* were performed in all isolates for B115 strain identification according to Adone et al. [17]. In addition, PCR and sequencing analysis of genes *manC<sub>oag</sub>*, *manCore* and *wboA* (also involved in LPS synthesis) were performed in *B. melitensis* isolates, showing smooth phenotype, recovered from ewe 32544. Isolates from ewe 33806 and 32544 were further typed using Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA) [25].



**Table 1**

Bacteriological findings on the day of abortion/parturition and 7, 14, 21 and/or 28 days after in ewes vaccinated with *B. melitensis* B115 (SC;  $1-2 \times 10^9$  CFU/animal) at midpregnancy and non-vaccinated sheep.

| ID.                | Experimental group <sup>a</sup> | Mean pregnancy duration (days) | Reproductive outcome <sup>b</sup> | Abortion/parturition day (d.p.v.) <sup>c</sup> | Vaginal swabs (d.p.r) <sup>d</sup> |   |    |    |                 | Milk (d.p.r) <sup>d</sup> |    |    |    | <i>Brucella</i> in fetus/lamb <sup>e</sup> |
|--------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------------|---|----|----|-----------------|---------------------------|----|----|----|--|
|                    |                                 |                                |                                   |  | 0                                  | 7 | 14 | 21 | 28              | 0                         | 7  | 14 | 21 |  |
| 34561              | VG                              | 168                            | 1                                 | 78   | –                                  | + | +  | +  | ND <sup>f</sup> | –                         | –  | –  | –  | 0  |
| 32544 <sup>g</sup> | VG                              | 153                            | 0                                 | 63   | +                                  | + | +  | +  | –               | +                         | –  | –  | –  | 1  |
| 33806              | VG                              | 148                            | 1                                 | 58   | +                                  | + | +  | +  | –               | –                         | +  | –  | –  | 0  |
| 34558              | VG                              | 147                            | 0                                 | 57   | +                                  | + | –  | –  | –               | –                         | +  | –  | –  | 1  |
| 32545              | VG                              | 145                            | 0                                 | 55   | +                                  | + | +  | –  | –               | –                         | ND | –  | –  | 1  |
| 34598              | VG                              | 151                            | 0                                 | 61   | +                                  | + | +  | –  | –               | –                         | –  | –  | ND | 1  |
| 34567              | VG                              | 160                            | 1                                 | 70   | +                                  | + | +  | +  | –               | –                         | –  | –  | –  | 0  |
| 34595              | VG                              | 159                            | 0                                 | 70   | +                                  | + | +  | –  | –               | +                         | –  | ND | –  | 1  |
| 33770              | NVG                             | 170                            | 1                                 | 80   | –                                  | – | –  | ND | ND              | –                         | –  | –  | ND | 0  |
| 33798              | NVG                             | 163                            | 1                                 | 73   | –                                  | – | –  | –  | –               | ND                        | –  | –  | –  | 0  |
| 34602              | NVG                             | 153                            | 0                                 | 63   | –                                  | + | –  | –  | –               | +                         | –  | –  | ND | 1  |

<sup>a</sup> VG, B115 vaccinated group; NVG, non-vaccinated group.

<sup>b</sup> Parturition = 1; Abortion/non-viable lamb = 0.

<sup>c</sup> Day post vaccination at which abortion/parturition took place.

<sup>d</sup> Days post-reproductive outcome (d.p.r).

<sup>e</sup> A fetus/lamb is considered infected (=1) if *Brucella* spp. is isolated in lung/stomach content (fetus) or spleen/lung (lambs) and non-infected (=0) otherwise.

<sup>f</sup> ND, not determined.

<sup>g</sup> This ewe had another healthy lamb that was slaughtered at the end of the experiment (No *Brucella* spp. was recovered from lung and spleen).

## 2.6. Statistical analysis

Proportions of reactors at each test in the VG and NVG were compared using McNemar and Fisher Exact tests. Quantitative results on the ELISA and IFN tests were compared using Mann–Whitney and Wilcoxon tests. All statistical analyses were carried out using the software WIN PEPI 4.0 [26] and SPSS 19 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, New York, USA).

## 3. Results and discussion

No side effects were observed in the vaccinated animals in the following weeks after B115 immunization. Five (62.5%) out of the 8 vaccinated animals had an abortion (with one of them having also a healthy lamb), a similar proportion to that observed using Rev.1 in small ruminants under similar conditions [9,27]. Among the three pregnant NV animals, one ewe aborted (suggesting the horizontal transmission of the B115) and the other two sheep had normal parturition (Table 1), and thus no significant differences were observed in the proportion of abortions in VG and NVG (Fisher's exact test,  $P=0.55$ ). Mean duration of pregnancy and reproductive outcomes of each animal are summarized in Table 1. Difference in the duration of the gestation between animals having normal deliveries (mean  $\pm$  SD,  $161.8 \pm 3.878$  days) and animals having an abortion ( $151.3 \pm 2.062$  days) was close to significant (Mann–Whitney test,  $P=0.052$ ). The occurrence of the abortions in an advanced stage of the pregnancy (55–77 days after immunization) may indicate a lower virulence of B115 compared with the Rev.1 or 16M strains, which usually induce reproductive failures at 28–42 [28] and 27–51 days after exposure, respectively [29,30]. Still, our findings suggest a non-negligible residual virulence in pregnant ewes, in line with previous results in mice (in which the B115 strain was recovered from the spleen of infected mice 60 days after inoculation) [17].

Regarding bacteriology results, B115 strain was recovered from only three (37.5%) and one (12.5%) vaccinated animals at 7 and 14 days post-vaccination, respectively. Then, one vaccinated animal (id. 33806) was again positive at 7 days post-abortion. Bacteriological results from milk and vaginal swabs after reproductive outcome are summarized in Table 1. No significant (Fisher's exact test;  $P>0.05$ ) differences in the proportion of *Brucella*-positive milk samples were observed depending on the reproductive outcome or experimental group. Regarding vaginal swabs results, no significant

differences were observed between the proportion of *Brucella*-positive ewes in the day of abortion/parturition and that observed at 7, 14 and 21 days (McNemar test,  $P>0.05$ ) in the VG. B115 was isolated from the lung/stomach content of all examined fetuses (Table 1). In contrast, no positive results were obtained in the samples from lambs and adult animals. The rough phenotype of all *Brucella* isolates was demonstrated by Crystal violet staining and Acriflavine test except in four cultures recovered from ewe 32544 (from milk and vaginal swab) and her fetus (lung and stomach content) in which a mixture of smooth and rough isolates was found. Rough and smooth phenotypes were confirmed by sequencing of the *wzm* gene PCR product in all isolates except in two cases, in which the same sequence of the 16M strain (a smooth *B. melitensis*) was found in spite of a rough phenotype. These results may compromise the value of *wzm* gene as a molecular marker of the B115 strain as previously proposed [31]. Sequencing of the other studied genes (*manC<sub>oag</sub>*, *manC<sub>ore</sub>* and *whoA* genes) in smooth isolate recovered from lung of ewe 32544 revealed mutations typically observed in the rough B115 strain. The rough and smooth isolates (recovered from ewes 33806 and 32544, respectively) analyzed by MLVA showed the same profile (data not shown) demonstrating their genetic relatedness and suggesting that a reversion of the B115 strain may have occurred in ewe 32544. This reversion may be probably related to, at least, one mutation in the genes involved in the LPS biosynthesis or transport considering the apparent intracellular position of O-PS in B115 strain [32]. Dissociation of rough to smooth *Brucella* strain, such as the one observed in our study, has been previously reported (as in the case of the natural rough mutant of *B. abortus* 45/20). The mutation observed here could have occurred in vivo after inoculation of the rough B115 or in vitro before inoculation, so a proportion of the inoculum would be in the smooth form. As two different vials were used (with five and three animals vaccinated with each one) but the smooth strain was only recovered from one animal, and only two reactors in the RBT/CFT were detected, the first hypothesis may seem more plausible.

A strong (75% (6/8) of reactors using B115-CFT at 21 days after vaccination) and long-lasting (100% (8/8) of B115-CFT seropositive animals at 108 days post-immunization) serological response was observed in VG after immunization (Table 2). Only one animal (34602) in the NVG had a positive serological response to the RBT (at day 99; 35 days after abortion), while all were negative

**Table 2**

Serological response detected in ewes vaccinated with B115 at midpregnancy and three non-immunized pregnant ewes using B115-Complement Fixation Test, Rose Bengal Test, S99-Complement Fixation Test and blocking ELISA from 0 (day of vaccination) to 108 days after immunization.

| ID.   | Experimental group | Reproductive outcome | Abortion/parturition day (d.p.v.) | Technique             | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | 28 | 45 | 63 | 70 | 76 | 83 | 91 | 99 | 108 |
|-------|--------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| 34561 | VG                 | 1                    | 78                                | B115-CFT <sup>a</sup> | – | – | – | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT <sup>b</sup>  | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | + | +  | +  | +  | –  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
| 32544 | VG                 | 0                    | 63                                | B115-CFT              | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | +  | +  | +  | +  | +   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | + | +  | +  | –  | –  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
| 33806 | VG                 | 1                    | 58                                | B115-CFT              | – | – | + | +  | +  | +  | –  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
| 34558 | VG                 | 0                    | 57                                | B115-CFT              | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | + | +  | –  | –  | –  | –  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
| 32545 | VG                 | 0                    | 55                                | B115-CFT              | – | – | – | –  | –  | –  | –  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | – | –  | –  | –  | –  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
| 34598 | VG                 | 0                    | 61                                | B115-CFT              | – | – | – | +  | +  | +  | –  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | – | +  | +  | +  | –  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
| 34567 | VG                 | 1                    | 70                                | B115-CFT              | – | – | – | +  | +  | +  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | + | –  | –  | +  | –  | –  | –  | –  | +  | +  | +  | +   |
| 34595 | VG                 | 0                    | 70                                | B115-CFT              | – | – | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | + | +  | +  | +  | –  | –  | –  | +  | +  | +  | +  | –   |
| 33720 | NVG                | 1                    | 80                                | B115-CFT              | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
| 33798 | NVG                | 1                    | 73                                | B115-CFT              | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
| 34602 | NVG                | 0                    | 63                                | B115-CFT              | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | RBT-CFT               | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | bELISA                | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |
|       |                    |                      |                                   | B115-CFT              | – | – | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –   |

<sup>a</sup> B115-CFT: Complement Fixation Test based on the detection of antibodies against B115-rough antigen.

<sup>b</sup> RBT-CFT: serial use of the Rose Bengal Test and Complement Fixation Test.

to the CFT and blocking ELISA throughout the experiment. In the VG only two sheep (32545 and 34598) were RBT-reactors at one sampling point (76 and 91 days after vaccination, respectively). Similarly two animals also reacted at some stage in the S99-CFT (ewe 34598 from 7 days post-abortion until the end of the experiment and ewe 32544 at 42 and 50 days post-abortion). Previous studies have reported the presence of low titer of agglutinins or antibodies to smooth *Brucella* cells after B115 inoculation although no S-LPS could be extracted from the inoculated strains [19,32]. The number of false positive animals that could be detected with a serial use of RBT-CFT (as used in the Spanish SRB eradication program) after B115 vaccination may be low (Table 2), especially if it is compared with the number of reactors expected after Rev.1 vaccination (approximately 100% of animals two weeks after subcutaneous immunization [27]). Moreover, the use of the B115-CFT would, on the other hand, allow the identification of the B115 vaccinated. Reproductive failures were registered in the three RBT and/or CFT reactors sheep (32545, 34598 and 34602) and in the animal from which the smooth isolates were recovered (but not in the remaining two animals that had an abortion). Thus, the occurrence of an in vivo reversion of the phenotype (from smooth to rough) may be related with an increased virulence of the strain, although the limited number of animals included in the study prevents from extracting definitive conclusions. Regarding bELISA results, a fast and strong response (6/8 reactor at 7 d.p.v.) was detected after B115-vaccination. Later, the proportion of bELISA reactors decreases until the abortion/parturition period (55–77 days after immunization), after which the percentage of positive animals increased again (7/8 reactors at 108 d.p.v.) (Table 2).

The proportion of IFN- $\gamma$  positive animals detected throughout the experiment using the smooth and rough antigens followed a similar trend although the proportion of samples detected using the smooth antigen was higher in all sampling points as previously observed in animals exposed to smooth strains [33]. However, differences depending in the proportion of reactors were not significant (McNemar test,  $P > 0.05$ ). Similarly, the quantitative response was also higher in the samples stimulated with the smooth antigen compared with the rough antigen, although significant differences (Mann-Whitney  $U$  test,  $P = 0.039$ ) were only observed in the sampling performed 28 d.p.v. The results could be reminiscent of a smooth phenotype priming due to reversion of the inoculated strain but there is not enough scientific evidence to fully support this hypothesis. In the NVG only one ewe (33798) was classified as IFN- $\gamma$ -positive at 70 d.p.v. In the VG, the proportion of IFN- $\gamma$  positive animals peaked first at 28 days after B115 immunization (62.5%; 5/8) in the VG, increasing again around abortion/parturition with 7/8 reactors by the end of the experiment (Table 3), and thus demonstrating the immunogenicity of the B115 strain. Regarding the reproductive outcome, in the period between immunization-parturition/abortion sheep that had a normal parturition showed a lower IFN- $\gamma$  response than aborted animals, but the IFN- $\gamma$  response after the parturition was higher than that observed after abortion. However, no significant (Mann-Whitney  $U$  test,  $P > 0.05$ ) differences depending on the reproductive outcome were observed at any sampling point regardless the antigen (smooth or rough) used.

In summary, the abortifacient effect of B115 in a proportion of the pregnant ewes vaccinated at the maximum susceptibility stage of pregnancy suggest that it may not be safe enough to be used in

**Table 3**

Results of the interferon-gamma assay performed on samples from eight B115-vaccinated ewes at midpregnancy and three non-immunized pregnant ewes from 0 (day of vaccination) to 108 days after immunization.

| ID. ewe | Experimental group | Reproductive outcome | Abortion/parturition day (d.p.v.) | Days after vaccination |   |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------|--------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
|         |                    |                      |                                   | 0                      | 7 | 14 | 28 | 63 | 70 | 76 | 83 | 91 | 99 |
| 34561   | VG                 | 1                    | 78                                | –                      | – | –  | –  | –  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 32544   | VG                 | 0                    | 63                                | –                      | – | –  | +  | –  | –  | –  | –  | –  | +  |
| 33806   | VG                 | 1                    | 58                                | –                      | – | –  | –  | +  | –  | +  | +  | +  | +  |
| 34558   | VG                 | 0                    | 57                                | –                      | + | +  | +  | –  | +  | –  | –  | +  | +  |
| 32545   | VG                 | 0                    | 55                                | –                      | – | –  | –  | –  | +  | –  | +  | +  | –  |
| 34598   | VG                 | 0                    | 61                                | –                      | + | –  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 34567   | VG                 | 1                    | 70                                | –                      | + | –  | +  | –  | –  | –  | +  | +  | +  |
| 34595   | VG                 | 0                    | 70                                | –                      | + | +  | +  | +  | –  | +  | +  | +  | +  |
| 33720   | NVG                | 1                    | 80                                | –                      | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  |
| 33798   | NVG                | 1                    | 73                                | –                      | – | –  | –  | –  | +  | –  | –  | –  | –  |
| 34602   | NVG                | 0                    | 63                                | –                      | – | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  | –  |

mass-vaccination campaigns without considering the reproductive status of vaccinated animals. The possible occurrence of in vivo phenotype reversion phenomena (from rough to smooth) could affect both its attenuation and its ability to be used in adult animals to avoid vaccine-related positive serological responses. However, its use in adult animals could be interesting given the low proportion of positive responses that can be expected in the routine SRB diagnostic tests used in eradication campaigns. For these reasons, further studies in a larger number of sheep would be necessary to better determine the stability of the B115 in sheep and the degree of protection conferred by its vaccination before giving it further consideration as a possible candidate for SRB vaccination.

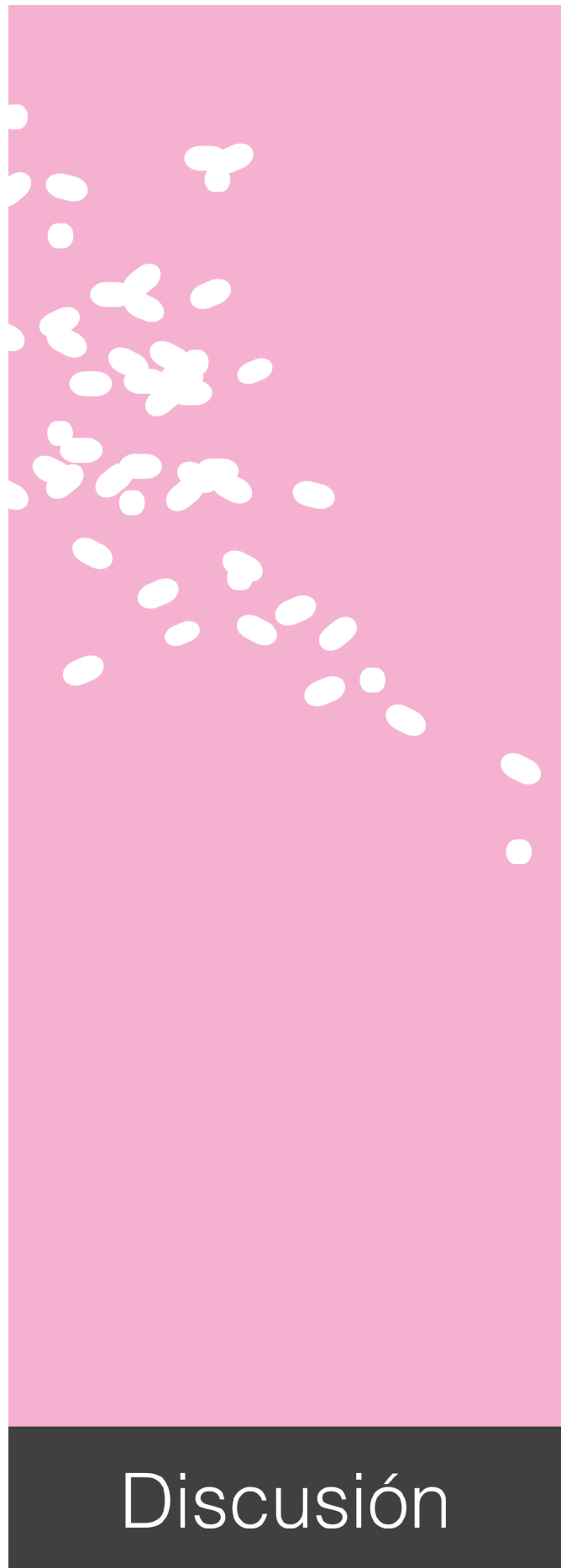
#### Acknowledgment

This study was supported by AGL2009-12674 project (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).

#### References

- [1] Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997;3(2):213–21.
- [2] FAO. *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East. In: FAO Animal Production and Health Proceedings 10. 2009.
- [3] Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsiaras E. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005;352(22):2325–36.
- [4] Herzberg M, Elberg SS. Immunization against *Brucella* infection. I. Isolation and characterization of a streptomycin-dependent mutant. *J Bacteriol* 1953;66(5):585–99.
- [5] Alton GG, Elberg SS. Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of study. *Vet Bull* 1967;37(11):793–800.
- [6] Banai M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol* 2002;90(1–4):497–519.
- [7] Blasco JM. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* 1997;31(3–4):275–83.
- [8] Olsen SC. Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination. *Rev Sci Tech* 2013;32(1):207–17.
- [9] Jimenez de Bagues MP, Marin CM, Barberan M, Blasco JM. Responses of ewes to *B. melitensis* Rev.1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann Rech Vet* 1989;20(2):205–13.
- [10] Blasco JM, Diaz R. *Brucella melitensis* Rev.-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet* 1993;342(8874):805.
- [11] Fensterbank R, Pardon P, Marly J. Comparison between subcutaneous and conjunctival route of vaccination with Rev. 1 strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. *Ann Rech Vet* 1982;13(4):295–301.
- [12] Martins H, Garin-Bastuji B, Lima F, Flor L, Pina FA, Boinas F. Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal – outcome of a 5-year programme (2002–2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination. *Prev Vet Med* 2009;90(1–2):80–9.
- [13] Samartino LE. Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* 2002;90(1–4):71–80.
- [14] Sanz C, Saez JL, Alvarez J, Cortes M, Pereira G, Reyes A, et al. Mass vaccination as a complementary tool in the control of a severe outbreak of bovine brucellosis due to *Brucella abortus* in Extremadura, Spain. *Prev Vet Med* 2010;97(2):119–25.
- [15] el Idrissi AH, Benkirane A, el MM, Bouslikhane M, Berrada J, Zerouali A. Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. *Rev Sci Tech* 2001;20(3):741–7.
- [16] Jones LM, Diaz R, Taylor AG. Characterization of allergens prepared from smooth and rough strains of *Brucella melitensis*. *Br J Exp Pathol* 1973;54(5):492–508.
- [17] Adone R, Francia M, Ciuchini F. Evaluation of *Brucella melitensis* B115 as rough-phenotype vaccine against *B. melitensis* and *B. ovis* infections. *Vaccine* 2008;26(38):4913–7.
- [18] Adone R, Francia M, Pistoia C, Pesciaroli M, Pasquali P. *B. melitensis* rough strain B115 is protective against heterologous *Brucella* spp. infections. *Vaccine* 2011;29(14):2523–9.
- [19] Morgan WJ, Littlejohn AI, Mackinnon DJ, Lawson JR. The degree of protection given by living vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in goats. *Bull World Health Organ* 1966;34(1):33–40.
- [20] Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, France: INRA Publications; 1988.
- [21] Adone R, Francia M, Ciuchini F. *Brucella melitensis* B115-based complement fixation test to detect antibodies induced by *Brucella* rough strains. *J Appl Microbiol* 2008;105(2):567–74.
- [22] Weynants V, Godfroid J, Limbourg B, Saegerman C, Letesson JJ. Specific bovine brucellosis diagnosis is based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *J Clin Microbiol* 1995;33(3):706–12.
- [23] OIE. Bovine Brucellosis Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals; 2009 [chapter 2.4.3].
- [24] Hinic V, Brodard I, Thomann A, Cvetic Z, Makaya PV, Frey J, et al. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J Microbiol Methods* 2008;75(2):375–8.
- [25] Le Fleche P, Jacques I, Grayon M, AIDS, Bouchon P, Denoeud F, et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 2006;6:9.
- [26] Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 2004;1(1):6.
- [27] Zundel E, Verger JM, Grayon M, Michel R. Conjunctive vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine: safety and serological responses. *Ann Rech Vet* 1992;23(2):177–88.
- [28] Ebrahimi M, Nejad RB, Alamian S, Mokhbalsafa L, Abedini F, Ghaderi R, et al. Safety and efficacy of reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev. 1 vaccine in pregnant Iranian fat-tailed ewes. *Vet Ital* 2012;48(4):405–12.
- [29] Duran-Ferrer M, Leon L, Nielsen K, Caporale V, Mendoza J, Osuna A, et al. Antibody response and antigen-specific gamma-interferon profiles of vaccinated and unvaccinated pregnant sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* 2004;100(3–4):219–31.
- [30] Jacques I, Verger JM, Laroucau K, Grayon M, Viscaino N, Peix A, et al. Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by bp26 and omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants in sheep. *Vaccine* 2007;25(5):794–805.
- [31] Adone R, Muscillo M, La RG, Francia M, Tarantino M. Antigenic, immunologic and genetic characterization of rough strains *B. abortus* RB51, *B. melitensis* B115 and *B. melitensis* B18. *PLoS ONE* 2011;6(10):e24073.
- [32] Cloeckaert A, Zygmunt MS, Nicolle JC, Dubray G, Limet JN. O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *J Gen Microbiol* 1992;138(6):1211–9.
- [33] Bercovich Z, Dekker T, Eger A, Haagsma J. A comparison of the potency of several *Brucella* allergens used to detect brucellosis in cattle. *Vet Res Commun* 1996;20(2):141–51.







La presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de diferentes alternativas diagnósticas y profilácticas para intentar dar solución a las principales dificultades que complican en la actualidad la erradicación de la brucelosis producida por *Brucella melitensis*.

A pesar de los esfuerzos realizados en la lucha contra esta zoonosis, la brucelosis ovina y caprina (BOC; causada por *Brucella melitensis*) (OIE, 2009b) continúa siendo una importante enfermedad en cuatro de los seis continentes con consecuencias dramáticas no sólo para la salud pública (es responsable de más de medio millón de casos de brucelosis humana cada año) (Pappas *et al.*, 2005) sino también para la sanidad animal (descenso de la producción, restricciones comerciales, etc.) (Crespo, 1994). Las estrategias puestas en práctica en la lucha contra la brucelosis de los pequeños rumiantes son semejantes a las medidas adoptadas con éxito contra la brucelosis bovina causada por *B. abortus*. Sin embargo, el resultado de las mismas en el caso de la BOC dista en ocasiones del observado en la brucelosis bovina. A pesar de la homología existente entre la brucelosis causada por *B. melitensis* y la originada por *B. abortus* (patogenia, sintomatología, etc.) (Díaz-Aparicio y Díaz, 2013), existen una serie de factores relacionados con la compleja epidemiología de BOC que condicionan la eficacia de las estrategias de lucha contra esta enfermedad. Por un lado, los factores asociados al propio agente etiológico, como la elevada resistencia ambiental de *B. melitensis*



(Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001) (que obliga a maximizar las medidas higiénico-sanitarias empleadas en la lucha contra BOC) y su relativa inespecificidad de hospedador (que posibilita transmisión entre diferentes especies animales como los bovinos) (Kahler, 2000; Verger *et al.*, 1989). Por otro lado, existen ciertas prácticas de manejo propias de los pequeños rumiantes (tales como el nomadismo, la trashumancia y el aprovechamiento de pastos comunales) (Blasco y Molina-Flores, 2011) que favorecen la difusión de *B. melitensis* y dificultan el éxito de los programas contra BOC. A todo ello debe sumarse la existencia de una serie de limitaciones de las pruebas diagnósticas (como una imperfecta sensibilidad en infecciones crónicas y latentes) (Blasco, 2010a; Díaz-Aparicio y Díaz, 2013; Godfroid *et al.*, 2013a; Herrera *et al.*, 2011) y las medidas profilácticas (p.e. la interferencia diagnóstica y la virulencia residual de la vacuna Rev. 1, única vacuna disponible en la actualidad) (Jiménez de Bagues *et al.*, 1989; OIE, 2009b; Zundel *et al.*, 1992) empleadas en la lucha contra BOC.

En este complejo escenario epidemiológico el empleo de herramientas moleculares constituye una valiosa herramienta en la lucha frente a esta patología. El primer capítulo de la presente tesis recoge tres estudios que demuestran la utilidad de las técnicas de detección y caracterización molecular de *Brucella* en la lucha frente a la brucelosis de los rumiantes a través de varias posibles aplicaciones: i) el diagnóstico directo a partir de muestras clínicas, ii) la identificación y caracterización de las especies zoonóticas de *Brucella* presentes en un país donde la enfermedad es endémica y iii) el estudio epidemiológico de un brote de *B. melitensis* en ganado bovino.

El cultivo a partir de muestras clínicas es la técnica de referencia (*gold standard*) para la confirmación de la brucelosis animal (Alton *et al.*, 1988; OIE, 2009b). Sin embargo, a pesar de constituir una prueba inapelable de la infección de *B. melitensis*, existen ciertos aspectos (por ejemplo, elevados requerimientos técnicos y de personal especializado) que limitan su aplicación a gran escala. En este escenario, las técnicas moleculares han emergido en los últimos años como una alternativa práctica al cultivo para la detección directa de *Brucella*. La PCR ha sido la técnica molecular más estudiada para la detección del agente causal de BOC en muestras clínicas (Amin *et al.*, 2001; Cetinkaya *et al.* 1999; Colmenero *et al.* 2011;

Ilhan *et al.* 2007; Ilhan *et al.* 2008; Leal-Klevezas *et al.* 1995; Leyla *et al.*, 2003; Samadi *et al.*, 2010) si bien no es una herramienta exenta de inconvenientes, y su aplicación requiere el empleo de equipamiento sofisticado que normalmente está fuera del alcance de los servicios veterinarios en algunas zonas donde esta enfermedad es endémica. La técnica LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) (Notomi *et al.*, 2000) puede constituir una interesante alternativa diagnóstica, ya que se basa en la amplificación isotérmica de secuencias de ADN específicas sin la necesidad de equipamiento específico de alto nivel (Gill y Ghaemi, 2008; Parida *et al.*, 2008). En el momento del inicio de este proyecto de tesis, tan sólo existía una técnica LAMP para *Brucella* (Ohtsuki *et al.*, 2008). Sin embargo, actualmente se han descrito otras cinco técnicas (Chen *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2011; Soleimani *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2012) para la detección de este patógeno, lo que respalda el interés que esta herramienta molecular ha suscitado en el campo del diagnóstico de la brucelosis animal. Todas ellas han mostrado resultados prometedores pero, y de manera similar a lo descrito para mayoría de técnicas PCR disponibles para el diagnóstico de *Brucella* (Yu y Nielsen, 2010), no han sido sometidas a una validación exhaustiva en un panel representativo de muestras clínicas de distinta naturaleza que avalen su utilidad práctica en el diagnóstico de la brucelosis animal. En este contexto y ante la acuciante necesidad de disponer de técnicas confirmatorias de la infección por *Brucella* aplicables en diferentes entornos epidemiológicos, se llevó a cabo la puesta a punto de una técnica LAMP basada en una diana genética de copia múltiple (IS711) (Ouahrani *et al.*, 1993) y su validación sobre un amplio panel de muestras clínicas (n=88) de diferente naturaleza recogidas de un diverso espectro de hospedadores. La nueva LAMP (LAMP-IS711) se diseñó para la detección de este fragmento de copia múltiple, intentando así incrementar la sensibilidad analítica de la detección directa de *Brucella* en comparación con las otras técnicas LAMP para *Brucella* (basadas en dianas de copia única). La diana IS711 ha sido empleada con éxito en diferentes técnicas de PCR (Bounaadja *et al.*, 2009; Bricker y Halling, 1994; Hinic *et al.*, 2008; Ouahrani-Bettache *et al.*, 1996; Tomaso *et al.*, 2010) incrementando la sensibilidad en comparación con la observada en técnicas dirigidas a dianas de copia única (Bounaadja *et al.*, 2009). Sin embargo el umbral de detección de la LAMP-IS711 (99fg) está en los rangos descritos para las otras técnicas, siendo ligeramente inferior al de algunas de ellas (Ohtsuki *et al.*: 10fg; Lin *et al.* 9fg; Soleimani *et al.*: 0.56 fg) y superior a la de la técnica descrita por Pan *et*

*al.*, (10pg). A pesar de ello estos resultados no le restan una posible utilidad práctica a la técnica desarrollada. De hecho, Lin *et al.* (Lin *et al.*, 2011) realizaron un estudio de la capacidad de detección de su LAMP y una técnica de PCR (cuyo límite de detección era 99fg, muy similar al de nuestra técnica) sobre un panel de muestras clínicas [leche (n=78) y sangre (n=113) de rumiantes seropositivos; sangre de personas seropositivas (n=11); leche de rumiantes sanos (n=40) y sangre de personas sanas (n=10)]. Estos autores demostraron una alta concordancia entre ambas técnicas (99%) a pesar de la diferencia en la sensibilidad analítica observada. Este hecho sugiere que la sensibilidad de la LAMP-IS711 sería lo suficientemente alta como para permitir su potencial aplicación en el campo.

La técnica resultó ser una buena alternativa al cultivo y la PCR en tiempo real (no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de las tres técnicas;  $p > 0.05$ ) cuando fue aplicada sobre muestras de ovino provenientes de fetos de abortos por *B. melitensis* (n= 46) y muestras de leche recogidas en torno al aborto (n= 14). Esto podría estar asociado a la inclusión de muestras con una alta carga bacteriana, lo que incrementa la probabilidad de detección de *Brucella* con cualquier técnica minimamente sensible. Con el fin de evaluar la capacidad de detección de las técnicas en especímenes con una carga bacteriana presumiblemente inferior se evaluaron también muestras de ganglios mamarios (n= 21) procedentes de ovejas infectadas por *B. melitensis*. La evaluación de estas muestras puso de manifiesto una menor capacidad de las técnicas estudiadas para detectar *Brucella* en este tipo de especímenes, ya que tan sólo se detectó el 42,9% de muestras mediante las técnicas moleculares y el 47,6% mediante bacteriología. Al comparar los resultados obtenidos en muestras de ganglio mamario y leche (cinco de las 14 muestras de leche evaluadas provenían de madres cuyo ganglio mamario había sido incluido en este mismo estudio) se observaron importantes diferencias en los resultados obtenidos [menos del 50% (10/21) de los ganglios mamarios resultaron positivos mientras que el 85.7% (12/14) de las muestras de leche fueron positivas]. Otros investigadores han descrito el mismo fenómeno (menor tasa de aislamiento de *Brucella* en ganglios mamarios que en leche) en el ganado bovino (Xavier *et al.*, 2009). Este hecho puede deberse a la relación directa existente entre la carga bacteriana y el estado de infección del animal objeto de estudio (O'Leary *et al.*, 2006). Las muestras de leche se tomaron en momentos próximos al aborto, donde la excreción de *Brucella* en

ovejas es máxima (Alton, 1990; Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). Sin embargo, las muestras de ganglios mamarios se recogieron aproximadamente en las 6-8 semanas posteriores al aborto, de tal modo que *Brucella* pudo acantonarse en este órgano en una baja concentración resguardada de la respuesta inmune del hospedador. Nuestros resultados respaldan lo observado por otros investigadores que afirman que *Brucella* puede permanecer en los ganglios mamarios en aproximadamente el 80% de los rumiantes, pudiendo ser excretada en leche (Blasco, 2010a; Hamdy y Amin, 2002). Este estudio también demuestra la utilidad de la recogida de muestras de leche en momentos cercanos al aborto para la detección directa de *Brucella*, permitiendo la confirmación de la infección a nivel de rebaño en caso de sospecha de BOC en una explotación. Sin embargo, la excreción intermitente de esta bacteria a través de la leche (Alton *et al.*, 1988) puede condicionar las posibilidades de detección de *B. melitensis* en este tipo de especímenes, por lo que el momento de toma de muestras y la representatividad del muestreo serán factores críticos para optimizar la utilidad de esta estrategia diagnóstica.

De manera adicional, y con la finalidad de evaluar la versatilidad de la LAMP-IS711 en muestras de diferentes especies domésticas seropositivas a *Brucella*, se incluyeron tres muestras procedentes de bovinos adultos ('pool' de muestras de bazo y ganglio mamario) y cuatro de porcino adulto (hisopos vaginales). La técnica LAMP-IS711 no detectó una de las tres muestras de bovino clasificadas como positivas por la RT-PCR y el cultivo, aunque obtuvo mejores resultados que la bacteriología en las muestras porcinas. Estos resultados subrayan lo observado en las muestras de ganado ovino sobre las diferencias en la capacidad de detección de la LAMP en muestras de animales adultos. En cualquier caso, y considerando la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la proporción de muestras clínicas positivas en función de su naturaleza (diferentes tejidos /leche/hisopo vaginal), la combinación de distintas muestras clínicas permitiría maximizar la probabilidad de detección de *Brucella* en un animal infectado como ha sido sugerido previamente (Garin-Bastuji *et al.*, 1998; Marín *et al.*, 1996). Así, y con el fin de optimizar el coste y el tiempo que requieren estos análisis, las diferentes muestras clínicas de un animal podrían procesarse en forma de 'pooles', si bien se ha de considerar el efecto de dilución sobre las posibilidades de detección del agente etiológico. Las discrepancias observadas entre los resultados obtenidos mediante la LAMP-IS711 y la RT-

PCR/cultivo tanto en muestras de fetos como de animales adultos han puesto de manifiesto la utilidad de combinar más de una técnica diagnóstica directa para incrementar las posibilidades de detección de *Brucella* en muestras clínicas en la línea que ha sido descrita previamente (Ilhan *et al.*, 2008; Marianelli *et al.*, 2008). De acuerdo a los resultados del presente estudio, esta estrategia diagnóstica parece ser especialmente interesante en el caso de muestras de ovejas, vacas y cerdos adultos seropositivos, aunque el bajo número de especímenes de este tipo incluidos en el estudio no permite extraer conclusiones definitivas.

El conocimiento del escenario epidemiológico sobre el que se van a aplicar las medidas de lucha y control contra la brucelosis de los pequeños rumiantes es un requisito imprescindible para la elección de las estrategias de control más adecuadas a la zona de actuación (Godfroid *et al.*, 2013a). Las técnicas moleculares pueden arrojar luz a este respecto, permitiendo disponer de información sobre las especies y cepas de *Brucella* presentes en la cabaña ganadera, lo que resulta fundamental para definir el marco epidemiológico en una determinada región (Godfroid *et al.*, 2013a; Kasymbekov *et al.*, 2013; Sanogo *et al.*, 2013). En este sentido, la técnica MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*) (De *et al.*, 2009; García-Yoldi *et al.*, 2007; Garofolo *et al.*, 2013; Le Fleche *et al.* 2006) ha sido ampliamente utilizada en estudios de epidemiología de brucelosis animal en los últimos años (García-Yoldi *et al.* 2007; Garofolo *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2011; Kattar *et al.*, 2008; Marianelli *et al.*, 2007; Tiller *et al.*, 2009). Para completar el primer capítulo de la presente tesis doctoral se han incluido dos ejemplos de la utilidad de las herramientas moleculares en el control de la brucelosis causada por *B. melitensis* en rumiantes domésticos en dos situaciones radicalmente diferentes: un país con la brucelosis animal es un problema endémico (Egipto) con limitados recursos dedicados al control de la enfermedad, y una región de baja prevalencia en España en la que se detectó un brote en explotaciones de bovino oficialmente libres de brucelosis.

La complicada situación epidemiológica de la brucelosis animal en Egipto, reflejada en el amplio rango de hospedadores descrito hasta el momento (vacas, búfalos, cerdos, ovejas, cabras) (Refai, 2002) se vio confirmada por los hallazgos del estudio. A pesar de que se analizaron un número reducido de aislados de *Brucella*

(n=17), se describieron las tres principales especies zoonóticas de *Brucella* en muestras procedentes de cuatro especies de rumiantes domésticos (búfalos, vacas, ovejas y cabras). La especie predominante resultó ser *B. melitensis* biovar 3 (13 de los 17 aislados estudiados) en concordancia con lo descrito anteriormente (Refai, 2002). La frecuencia de aislamiento de esta especie, incluso en ganado bovino, podría ser una consecuencia directa de las medidas de control implementadas en la lucha contra *B. abortus* (inmunización con *B. abortus* S19, diagnóstico y sacrificio de reactivos, etc.) que provocaron una drástica reducción de la prevalencia de la brucelosis bovina. En contraste, el alcance de las medidas aplicadas en los pequeños rumiantes ha sido mucho más limitado, lo que podría haber contribuido a convertir a *B. melitensis* biovar 3 en la especie de *Brucella* más predominante en el país (Refai, 2002). Además de la ausencia de medidas de control estrictas, existen otras características de *B. melitensis*, tales como su inespecificidad de hospedador [en nuestro estudio se detectó en pequeños rumiantes pero también en vacas y búfalos, confirmando hallazgos anteriores en estas especies] (Refai, 2002; Samaha *et al.*, 2008) y ciertas prácticas de manejo e higiénico-sanitarias autóctonas del país que favorecen la transmisión y persistencia del patógeno [predominancia de explotaciones de pequeño tamaño donde conviven diferentes especies animales en estrecho contacto con las personas, así como el consumo de leche y productos lácteos no pasteurizados (Hegazy *et al.*, 2011; Holt *et al.*, 2011; Refai, 2002)]. Los perfiles de MLVA descritos en este trabajo revelaron una considerable heterogeneidad genética entre los aislados estudiados ( $h=0.801$ ), confirmando el gran poder de discriminación genética que posee esta técnica (Jiang *et al.* 2011; Kattar *et al.* 2008; Valdezate *et al.*, 2010). La hipervariabilidad observada en los *loci* pertenecientes al panel 2B evidencia una vez más el valor de este panel para el estudio de cepas epidemiológicamente relacionadas, por ejemplo aquellas provenientes de la misma región geográfica y/o brote de enfermedad (Kattar *et al.*, 2008; Valdezate *et al.*, 2010). Por otra parte, el análisis de *Neighbor Joining* de los aislados de *B. melitensis* reveló una cierta proximidad genética entre los aislados analizados y otras cepas de humanos y rumiantes domésticos descritos en países cercanos como Argelia y Túnez, poniendo de manifiesto una posible conexión epidemiológica entre estos países (por ejemplo, el intercambio de animales infectados sin los controles veterinarios necesarios). El presente trabajo ha puesto de manifiesto, además, la presencia de otras especies zoonóticas de *Brucella*

circulantes en la cabaña ganadera, lo que complica aún más el marco epidemiológico en el que aplicar las medidas de control contra la brucelosis animal. En los últimos años *B. abortus* sólo ha sido descrita de manera ocasional en el país (Refai, 2002), confirmando nuestro trabajo que el patógeno sigue pudiendo aislarse de muestras de animales infectados. Este trabajo representa además la primera descripción de *B. suis* biovar 1 en rumiantes en Egipto, si bien este patógeno ya se había descrito en el ganado bovino con anterioridad en Brasil y Colombia (Corbel, 1997). *B. suis* fue aislada de leche y de muestras de linfonodo mamario de dos vacas procedentes de Menofia y Beni-Suef. Estos resultados confirman lo sugerido anteriormente por otros investigadores (Ewalt *et al.*, 1997) sobre la posible excreción de *Brucella suis* en leche por el ganado bovino, lo que representa un potencial problema de salud pública dado el carácter zoonótico de este biotipo. Los perfiles de MLVA-15 descritos en el presente trabajo fueron patrones típicos de *B. suis* biotipo 1 pero diferentes entre sí. La población de ganado porcino presente en el país [aproximadamente 30.000 animales] (Refai, 2002) que pueden convivir en estrecho contacto con otras especies animales y la prevalencia de ganado porcino seropositivo a *Brucella* en algunas regiones del país (hasta un 12.61%) (Barakat *et al.*, 2011) son factores que resaltan la potencial importancia de nuestro hallazgo, si fuera este patógeno el agente causal de una proporción importante de las infecciones detectadas por serología en el cerdo. Desafortunadamente no hay datos disponibles sobre el posible contacto con ganado porcino de las vacas infectadas con *B. suis* descritas en este trabajo y, por tanto, de la posible fuente de infección de dichos animales. La compleja epidemiología de la brucelosis animal en Egipto revelada mediante técnicas moleculares en el presente estudio sugiere la importancia de investigar la distribución y prevalencia de las principales especies zoonóticas en la cabaña ganadera, así como el papel de los rumiantes y cerdos domésticos en el ciclo biológico de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* en la totalidad del país con el fin de establecer las medidas de control de brucelosis más adecuadas en las diferentes poblaciones animales.

El último trabajo recogido en la presente tesis sobre la aplicación de la técnica MLVA en la lucha frente a *B. melitensis* muestra la utilidad de esta herramienta molecular en el control de un brote en ganado bovino acontecido en España en 2007. La descripción de las especies de *Brucella* que afectan a la cabaña ganadera sobre



la que se va a aplicar las medidas de control es otro de los requisitos imprescindibles en el diseño de estrategias para el control de la brucelosis animal como, por ejemplo, las vacunas utilizadas para la inmunización de los animales. Los hospedadores preferenciales de *B. melitensis* son los pequeños rumiantes, pero su presencia se ha descrito en un amplio rango de hospedadores entre los que se encuentra el ganado bovino, donde se está convirtiendo en un problema emergente en muchos países (Corbel, 1997; Kahler, 2000; Verger *et al.*, 1989). El presente trabajo pone de manifiesto un ejemplo de este hecho en nuestro país: un brote de *B. melitensis* que afectó a más de 2.000 vacas y un total de siete personas producido en el noroeste de España en septiembre de 2007. El control de *B. melitensis* en el ganado bovino está dificultado por la ausencia de conocimientos sobre la epidemiología del patógeno en esta especie animal (Blasco, 2010a), así como la falta de vacunas de validez demostrada, a pesar de los indicios que sugieren una posible utilidad de la vacuna Rev. 1 (García-Carrillo, 1980; Horwell y van Drimmelen, 1971; van Drimmelen y Horwell, 1964), estando su empleo contemplado por la UE (2002/598/EC). La singularidad del brote obligó a tomar medidas alternativas de control que se ajustaran a cada una de las granjas involucradas, incluyendo estrictas medidas de bioseguridad, el sacrificio de animales reactivos y el empleo de la técnica MLVA para la identificación de la fuente de infección causante del brote. El brote afectó a un total de cuatro explotaciones [tres de leche (A-C) y una utilizada para mantener los animales en los meses anteriores al parto (D)] con más de 500 animales cada una, y relacionadas epidemiológicamente. El análisis de las posibles fuentes de infección apuntó a la población ovina de la zona, una vez confirmada la etiología de la misma (*B. melitensis*) y constatado que podían haber existido fallos de bioseguridad que permitieran el acceso de ovejas a la explotación D (en la que se mantenían los animales antes del parto), en la que, además, se registró un aborto (cuya etiología no se investigó) tres meses antes de la detección del brote. El estudio molecular realizado sobre aislados procedentes de animales de tres de las explotaciones, de personas afectadas (n=2) y de ovejas procedentes de una granja cercana a la explotación D confirmó la posible implicación de éstas en el origen del brote. A pesar de la existencia de cuatro perfiles de MLVA diferentes entre las 17 cepas caracterizadas, el hecho de que la hipervariabilidad de los *loci* 9 y 16 (los únicos dos polimórficos en el panel analizado) se haya puesto de manifiesto en anteriores estudios (García-Yoldi *et al.*, 2007; Tiller *et al.*, 2009) y que la mutación de un solo

*locus* en una misma cepa de *Brucella* debido a múltiples pases *in vivo* e *in vitro* (como lo que ocurre en el desarrollo de un brote) se haya observado previamente (Kang *et al.*, 2009; Whatmore *et al.*, 2006) sugiere que el brote fue causado por una cepa que pudo después mutar en el hospedador bovino. El presente trabajo ha puesto de manifiesto la importancia de adecuar las medidas de control tradicionales (como el sacrificio de reactores) y de nueva generación (como la aplicación de técnicas moleculares) disponibles a la situación epidemiológica de la zona con el fin de optimizar el resultado de las mismas en la lucha contra *B. melitensis*.

Por último, estos dos últimos estudios han evidenciado la importancia de afrontar la lucha contra la brucelosis animal adoptando una visión mas integradora de lo que suele realizarse en otras enfermedades infecciosas: la amplitud de hospedadores susceptibles a *B. melitensis* obliga a que las medidas de vigilancia y monitorización de este patógeno no se limiten a los hospedadores preferenciales (ovejas y cabras) sino que se apliquen a todos los animales susceptibles y en riesgo de infección por este patógeno (búfalos, camélidos y bovinos). Un ejemplo de la utilidad de aplicar esta filosofía de control lo encontramos en la brucelosis bovina: los grandes esfuerzos invertidos en la lucha de *B. abortus* han conllevado un control de este patógeno, pero esto no debe interpretarse como un control absoluto de la brucelosis en el ganado bovino ya que *B. melitensis*, si está presente en la zona, puede dar lugar a brotes de enfermedad en esta especie hospedadora.

El segundo capítulo de la presente tesis doctoral recoge tres trabajos que evalúan las bondades y los inconvenientes de la Rev. 1 (actualmente considerada como la vacuna más eficaz para el control de la brucelosis de los pequeños rumiantes) (Blasco, 2010a; Nicoletti, 2010; OIE, 2009b), así como de otras estrategias vacunales alternativas para paliar algunas de estas limitaciones. A pesar de que son muchos los trabajos que han evaluado diferentes aproximaciones para la vacunación contra BOC ninguno de ellos ha resuelto por completo estas limitaciones, por lo que la investigación en este sentido continúa siendo necesaria (particularmente en zonas desfavorecidas donde la vacunación con Rev. 1 sigue siendo la piedra angular del control de este patógeno). De manera similar a lo observado en la inmunización del ganado bovino con la vacuna lisa *B. abortus* S19 (Fensterbank y Plommet, 1979), la vía conjuntival se ha presentado como una buena estrategia vacunal para la

inmunización de corderas de 3-6 meses de edad, minimizando los problemas de abortos asociados a la vacunación con Rev. 1 y de interferencia diagnóstica en las pruebas serológicas empleadas tradicionalmente en la lucha contra *B. melitensis* (Fensterbank *et al.*, 1982a; Fensterbank *et al.*, 1985; Fensterbank *et al.*, 1987). A pesar de las bondades de la vía CJ, la dificultad para retener a los animales para inocular la dosis adecuada en la conjuntiva, el riesgo de difusión de la cepa vacunal viva derivada de este sistema de inmunización (con la consecuente contaminación del operador y el medio ambiente), así como la posibilidad de persistencia de animales reactivos a algunas pruebas serológicas empleadas en el diagnóstico de BOC, son algunos inconvenientes que dificultan su aplicación en el campo, especialmente cuando es necesario inmunizar un gran número de animales en cortos periodos de tiempo, como suele ocurrir en las campañas de saneamiento propias de los programas de control y erradicación de *B. melitensis*. La vía intradérmica ha demostrado ser una alternativa segura y efectiva para la inmunización contra enfermedades de la importancia de la rabia (Nicolas y Guy, 2008). En el caso de *Brucella*, la piel constituye una de sus posibles vías de entrada (World Health Organisation, Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Organization for Animal Health, 2006) y, por tanto, puede ser una buena opción para la inducción de la 'infección controlada' por Rev. 1 necesaria para evocar una respuesta inmune sólida contra *B. melitensis* (Herzberg y Elberg, 1953).

El primer estudio de este capítulo consistió en la valoración de la inmunogenicidad y la protección inducida por la Rev. 1 cuando es aplicada por vía intradérmica en ovejas de la raza Assaf de 3-6 meses de edad provenientes de tres granjas libres de brucelosis (de acuerdo a 91/68/EEC y RD1047/2003). La variabilidad de la respuesta inmune frente a *Brucella* asociada a diferentes factores del hospedador [especie, raza, edad, estado fisiológico, etc. (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001)] obliga a la inclusión de un grupo vacunal de referencia que permita valorar la existencia de factores externos que alteren la respuesta inmune observada. Por ello se incluyeron dos grupos de animales con las mismas características que los incluidos en el grupo ID pero que fueron vacunados por dos rutas empleadas tradicionalmente en la inmunización con Rev. 1: la vía conjuntival y la subcutánea. La vacunación intradérmica con Rev. 1 resultó ser una ruta de inmunización segura en concordancia con lo observado por Lim en ganado

bovino (Lim, 1988). La capacidad inmunógena de Rev. 1 aplicada por vía intradérmica quedó demostrada por la rápida respuesta serológica observada (79.4% reactivos a la interpretación en serie de RB-FC a los 14 días tras la vacunación], generalizada (aproximadamente el 99% de los animales vacunados fue reactor al menos a una prueba serológica en algún punto del estudio), intensa [valores cuantitativos de FC, ELISA de bloqueo (ELISAb) y ELISA indirecto (ELISAI) elevados] y duradera (con 38.8% reactivos a RB-FC a los 285 días de estudio). La fuerte capacidad inmunógena de la vacunación intradérmica puede explicarse por la propia composición de la dermis: una red de capilares sanguíneos y linfáticos que drenan de una manera eficiente los linfonodos cercanos, así como una población importante de células dendríticas y linfocitos mono y polimorfonucleares (Debenedictis *et al.*, 2001; Lambert y Laurent, 2008; Nicolas y Guy, 2008).

En concordancia con resultados anteriores (Fensterbank *et al.*, 1982a; Fensterbank *et al.*, 1985; Zundel *et al.*, 1992), el grupo SC presentó un mayor número de reactivos que el grupo CJ durante todo el periodo de estudio. Sin embargo respecto al grupo ID el porcentaje de reactivos y la respuesta cuantitativa registrada por la prueba de FC en el grupo SC fue menor a partir del día 60 tras la vacunación. Estos resultados contradicen las observaciones de Cotton (Cotton, 1953) quien demostró un rápido descenso de la respuesta serológica de vacas inmunizadas con *B. abortus* S19 por la vía intradérmica comparada con la respuesta observada en animales vacunados por vía subcutánea. La proporción de seropositivos (5.6% RB-FC; 14.8% FPA; 81.5% ELISAI; 63% ELISAb) en el grupo SC al final del estudio (285 días tras la vacunación) ponen de manifiesto una vez más la incompatibilidad de esta vía de inmunización con la estrategia del diagnóstico y sacrificio de reactivos en las campañas de lucha contra BOC. De acuerdo con lo observado previamente (Fensterbank *et al.*, 1982a; Zundel *et al.*, 1992), el grupo conjuntival (n= 68) registró la respuesta serológica más reducida en términos de número de reactivos y respuesta cuantitativa (sin que se detectaran reactivos al RB-FC a los 285 días tras la vacunación). Esto confirma la especificidad de la interpretación en serie de RB-FC para la diferenciación de los animales seropositivos vacunados por la ruta conjuntival en edades tempranas y animales infectados por *Brucella* sometidos a campañas de diagnóstico y sacrificio de reactivos en la lucha contra BOC. La inmunización de corderas de 3-6 meses de edad a dosis de  $1-2 \times 10^9$  UFC de Rev. 1 mediante la vía

conjuntival es la estrategia de vacunación más empleada actualmente en la lucha contra BOC en zonas donde la vacunación ha de ser compatible con la puesta en práctica de una estrategia de diagnóstico y sacrificio de animales reactivos.

Las pruebas serológicas actualmente disponibles permiten el análisis de un gran número de muestras (aplicación a gran escala), presentan requerimientos técnicos relativamente asequibles, permiten la obtención de resultados en periodos cortos de tiempo, etc. (Garin-Bastuji *et al.* 2006; World Health Organisation, Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Organization for Animal Health, 2006). Sin embargo presentan ciertas limitaciones en términos de sensibilidad (seronegatividad de animales crónicamente infectados o con infección latente) (Godfroid *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2011) y especificidad [aparición de falsos reactivos por anticuerpos vacunales (Alton, 1990; Fensterbank *et al.*, 1982a; OIE, 2009b) o infecciones con otras bacterias con LPS similar al de *Brucella*] (Corbel, 1985b; Morse *et al.*, 1953; Nielsen *et al.*, 1980; Nielsen *et al.*, 2004b) cuando se aplican en el marco de un programa de control de BOC. El presente trabajo ha evidenciado que el grado de interferencia diagnóstica derivado de los anticuerpos frente al LPS de Rev. 1 está directamente relacionado no sólo con la ruta de inmunización (como se ha comentado anteriormente) (Fensterbank *et al.*, 1982a; Fensterbank *et al.*, 1985; Fensterbank *et al.*, 1987; Zundel *et al.*, 1992), sino también con la técnica serológica empleada para el diagnóstico de BOC de acuerdo a lo descrito anteriormente (Anon, 2006). El FPA presentó una especificidad adecuada, comparable a la de la interpretación en serie de RB-FC que se emplea tradicionalmente en la lucha contra BOC en España, lo que sugiere que esta técnica puede ser una alternativa interesante como prueba de confirmación en ovejas vacunadas seropositivas tal y como se ha descrito previamente (Ramírez-Pfeiffer *et al.*, 2006). El patrón de reactivos registrado en las pruebas RB-FC y ELISAb fue similar, si bien al final del estudio el número de animales detectado por el ELISAb (CJ: 20%; SC: 63%; ID: 77.6%) fue significativamente mayor que el de RB-FC (CJ: 0%; SC: 5.6%; ID: 38.8%). La respuesta serológica detectada por el ELISAi fue más tardía que la observada con el resto de técnicas (detectando el máximo número de reactivos entre los 60-90 días tras la vacunación). Este hecho podría deberse al empleo de un conjugado con afinidad por las inmunoglobulinas G (producidas de manera tardía en la respuesta serológica frente a *Brucella*) (Jacques *et al.*, 1998), tal y como ha sido

observado previamente por otros investigadores (Stournara *et al.*, 2007). Algunos autores (Díaz-Aparicio *et al.*, 1994) han observado un incremento de la especificidad del ELISAi cuando la proteína G es empleada como conjugado. Sin embargo, el alto porcentaje de reactores observado a los 10 meses tras la vacunación (CJ: 48%; SC: 81.5%; ID: 87.5%) evidencia la incompatibilidad del empleo de esta técnica con la estrategia de vacunación de corderas unida al diagnóstico y sacrificio de animales adultos reactores.

Los animales pertenecientes a la granja 3 presentaron una respuesta serológica mas intensa que los de las granjas 1 y 2, si bien la presencia de *Brucella* en la granja se descartó ya que este rebaño había sido evaluado sistemáticamente dentro de las campañas nacionales de lucha contra BOC siendo negativo en los últimos 15 años. Otra hipótesis que podría explicar esta situación es la existencia de otros microorganismos (por ejemplo, *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel, 1985b) o *Escherichia coli* (Nielsen *et al.*, 2004b)) que pudieran dar reacciones cruzadas en las pruebas serológicas empleadas. La posible presencia de microorganismos diferentes de *Brucella* que indujeran anticuerpos reactivos en las pruebas serológicas empleadas podría ser la explicación de la existencia de algunos animales reactores en el grupo no vacunado. Estos falsos positivos podrían deberse también a la circulación de Rev. 1 entre los animales vacunados. Esta hipótesis se consideró no obstante poco probable debido a que: i) tan solo un animal del grupo control (no vacunado, n=48) fue reactor a las pruebas RB-CF en un muestreo (día 150 tras vacunación) y ii) la cepa vacunal sólo fue aislada en dos animales del grupo CJ del rebaño 2 del total de individuos muestreados (CJ: 34; SC: 31; ID: 33), en concordancia con las observaciones de otros autores que consideran que la excreción de Rev. 1 tras la vacunación es insignificante (Alton, 1990; Sales Henriques *et al.*, 1992; Stournara *et al.*, 2007; Zundel *et al.*, 1992)).

La larga duración de la respuesta serológica inducida por la vacunación intradérmica con Rev. 1 en ovejas provoca que sea una alternativa incompatible con los programas de erradicación que combinen la vacunación y el diagnóstico y sacrificio de adultos reactores. Sin embargo, podría ser una opción factible en áreas en desarrollo con recursos limitados donde el sacrificio de animales reactores no es económicamente viable y, por tanto no se ejecutan campañas de test y sacrificio. En

estas zonas geográficas, la brucelosis suele ser un problema endémico siendo la vacunación de un gran número de animales en un breve periodo de tiempo la mejor opción para el control de esta enfermedad. A la vista de estos prometedores resultados se hizo evidente la necesidad de realizar un estudio de valoración de la protección inducida por Rev. 1 aplicada intradérmicamente, ya que:

- Aunque una fuerte respuesta serológica post-vacunal no puede ser considerada como un parámetro fiable de la capacidad de esta vacuna para inducir protección en el individuo inmunizado (Morgan *et al.*, 1966), sí puede servir como un buen marcador de sensibilización frente *B. melitensis*;
- Se ha evidenciado que los anticuerpos pueden jugar un cierto papel en la resistencia frente a la infección por *Brucella* [como ha quedado demostrado en estudios de inmunidad pasiva con suero frente a LPS (Cloeckaert *et al.*, 1992a; Limet *et al.*, 1987; Montaraz *et al.*, 1986), proteínas de membrana (Cloeckaert *et al.*, 1991) y otras cepas de *B. melitensis* (Adone *et al.*, 2012)];
- La inmunización intradérmica permite el uso de dispositivos automáticos sin agujas que permiten la vacunación de un gran número de animales en cortos periodos de tiempo (Mousel *et al.*, 2008) y reduce el riesgo de accidentes derivados del uso de agujas y la formación de aerosoles (especialmente importante cuando se emplean vacunas vivas con virulencia residual, como es el caso de Rev. 1), minimizando la generación de residuos punzantes (Mitragotri, 2005) y la reutilización de agujas, y sin requerir personal altamente cualificado (Kim *et al.*, 2012), lo que convierte este modo de inmunización en un candidato muy atractivo para zonas con recursos limitados.

Así, se llevo a cabo un desafío experimental con *B. melitensis* 53H38 durante el inicio del último tercio de gestación de hembras primíparas de acuerdo a lo estipulado para la investigación sobre nuevas vacunas contra *Brucella melitensis* (*European Pharmacopoeia* 5.0, Bosseray, 1992; World Health Organisation, 1997). Para ello, un subgrupo de animales (n=87) pertenecientes al estudio de inmunogenicidad de la Rev. 1 descrito anteriormente fueron incluidos en este



experimento. Todos los animales del grupo control (n=14; que no habían sido previamente inmunizados) experimentaron un aborto por *Brucella* poniendo de manifiesto la eficacia de la infección experimental realizada de acuerdo a las directrices de la Farmacopea Europea. Los fallos reproductivos fueron observados entre los 24 y los 39 días tras la infección en concordancia con lo observado previamente (Durán-Ferrer *et al.*, 2004; Ebrahimi *et al.*, 2012). El grupo de animales vacunados (CJ=21; SC=24, ID=27) sufrió una tormenta de abortos entre los 22 y 64 días tras el desafío, llegando a abortar mas del 75% de los animales (CJ: 86.7%, SC: 68.8% e ID: 78.9%). No se observaron diferencias significativas en el número de fallos reproductivos observados en los diferentes grupos vacunales pero sí entre los animales vacunados (39/50; 78%) y el grupo control (14/14; 100%). La eficacia de la vacunación con Rev. 1 ha sido demostrada tanto en estudios experimentales (Alton, 1966; Durán-Ferrer *et al.*, 2004; Fensterbank *et al.*, 1982a; Fensterbank *et al.*, 1985; Fensterbank *et al.*, 1987) como en condiciones de campo en el contexto de programas de erradicación y control de diferentes países como Grecia y España (Minas *et al.* 2004; Ministerio de Agricultura, 2013), por lo que los resultados observados pueden considerarse sorprendentes. El alto porcentaje de fallos reproductivos observados en los animales inmunizados afectan severamente la validez externa del estudio e imposibilitan la obtención de conclusiones sobre la eficacia de la vacunación intradérmica con Rev. 1 frente a la infección de *B. melitensis*. Diferentes factores [como la mayor susceptibilidad a la infección por *B. melitensis* de razas de aptitud láctea, la existencia de un gran número de gestaciones múltiples, la posible inmunosupresión asociada al transporte que tuvo lugar aproximadamente dos semanas antes del desafío y la posible exposición a otros agentes abortivos (*Chlamydia abortus*)] pudieron afectar al resultado de la infección experimental. La realización de estudios específicos sobre el posible impacto de estos factores, y posiblemente otros no considerados, sobre las consecuencias del desafío experimental detectadas en este estudio serían necesarios para valorar la relevancia de las observaciones aquí descritas.

La respuesta inmune celular ha demostrado ser la piedra angular de la protección frente a *Brucella* (Stevens *et al.*, 1992), de tal modo que conocer la dinámica de producción de IFN- $\gamma$  (principal citoquina involucrada en la respuesta

inmune frente a este patógeno (Zhan y Cheers, 1993)) podría aclarar diferentes aspectos de la patogenia de *Brucella* (interacción bacteria-hospedador), así como contribuir al diseño de nuevos métodos de diagnóstico de BOC (por ejemplo, para la monitorización de la respuesta inducida tras la vacunación con Rev. 1). En el segundo trabajo de este capítulo se ha realizado un estudio comparativo de la producción de IFN- $\gamma$  en ovejas expuestas a dos cepas diferentes de *B. melitensis* (cepa virulenta H38 y cepa atenuada Rev.1) inoculadas mediante diferentes vías (SC, CJ e ID) valorando la influencia de diferentes factores relativos al hospedador (edad y estado reproductivo) sobre dicha respuesta. Para caracterizar de forma completa la respuesta inmune celular se realizó también una evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  en animales no expuestos previamente a *Brucella* (n= 155) con el fin de establecer el nivel basal de esta citoquina. Este estudio mostró la existencia de un número de falsos positivos a esta prueba (13/318 ó 28/318 en función del umbral empleado) en el grupo de animales no expuesto a *Brucella*. Existen varias posibles explicaciones a la aparición de niveles de IFN- $\gamma$  en animales no expuestos previamente a *Brucella*:

- i) La presencia de LPS en el preparado antigénico usado para la estimulación de la sangre de estos animales. Aunque el LPS no es el inductor principal de la respuesta inmune Th1 contra *Brucella*, algunos autores han descrito que esta molécula puede provocar una respuesta inmune celular inespecífica en el hospedador, como la producción de interferón en el modelo murino (Fernández-Lago *et al.*, 1996; Keleti *et al.*, 1974) y ganado bovino (Weynants *et al.*, 1995), y la reacción de hipersensibilidad IV observada en la prueba de la brucelina en ganado bovino (Bercovich *et al.*, 1993).
- ii) La existencia de una reacción cruzada debido a proteínas de *Brucella* comunes con otras bacterias como *Ochrobactrum anthropi*, tal y como se ha observado en la prueba de la brucelina (respuesta inmune celular) (Velasco *et al.*, 1997).
- iii) La inmadurez del sistema inmune de animales jóvenes que puede provocar reacciones inespecíficas y fluctuantes, tal y como se ha observado en el caso de la paratuberculosis en ganado bovino menor de un año (Huda *et al.*, 2003).

Las técnicas de detección de la respuesta inmune celular podrían servir también para diferenciar falsas reacciones positivas de reacciones en animales verdaderamente infectados (Bercovich *et al.*, 1993; Blasco *et al.*, 1994a). En este sentido, el estudio de la producción de IFN- $\gamma$  en animales vacunados de distintas explotaciones, una de las cuales (granja 3) presentaba un mayor nivel de seropositividad, demostró la ausencia de diferencias significativas en la producción específica de IFN- $\gamma$ , sugiriendo que las ovejas de esta explotación no experimentaron una exposición mayor a *Brucella* y confirmando las sospechas de que los seropositivos observados podrían deberse a reacciones inespecíficas posiblemente asociadas a la exposición a otros microorganismos (como *Y. enterocolitica* o *E. coli*) (Corbel, 1985b).

En la segunda parte del estudio se llevó a cabo una evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  durante seis meses en animales inmunizados con Rev. 1 por las vías CJ (n=30), SC (n=28) e ID (n=29) cuya respuesta serológica ya había sido monitorizada en el estudio sobre la inmunogenicidad de la vacunación ID. Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto la capacidad de la Rev. 1 para inducir una respuesta inmune celular en las ovejas inmunizadas de acuerdo a lo demostrado previamente (Sinha *et al.*, 2007). La respuesta celular observada en los animales inmunizados fue más temprana y descendió más rápidamente que la respuesta serológica detectada en estos animales, respaldando lo sugerido por algunos autores (Pasquali *et al.*, 2001) sobre la posibilidad de que el papel del IFN- $\gamma$  podría ser especialmente decisivo en las etapas más tempranas de la infección por *Brucella*. Pero, a diferencia de lo observado en la respuesta serológica post-vacunal, la respuesta celular volvió a los niveles basales detectados antes de la vacunación tan sólo 3 (grupo CJ) y 6 meses (ID y SC) después de la inmunización. A pesar de que la producción de IFN- $\gamma$  en los animales vacunados por vía conjuntival fue menor que la observada en los individuos de los grupos SC e ID durante todo el periodo de estudio, las diferencias observadas sólo fueron estadísticamente significativas a los siete días tras la vacunación, a diferencia de lo detectado mediante las pruebas serológicas [con las que las diferencias fueron estadísticamente significativas hasta los 6 (grupo SC) y 10 meses (grupo ID) usando la prueba RB-FC]. Como se ha comentado previamente, no existen métodos fiables para la monitorización de la correcta inmunización de los animales tras la vacunación con Rev. 1. Algunos autores

(Blasco, 1997; Blasco, 2010a; Rodríguez Ferri y Crespo, 2000) han propuesto que evidenciar un porcentaje mayor del 60% de reactores a los 20 días tras la vacunación (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000) es un buen indicativo de una correcta aplicación de la vacuna. Sin embargo, la respuesta serológica post-vacunal no es considerada un buen índice de la protección inducida (Morgan *et al.*, 1966) y, por tanto, no sería un buen indicador del éxito de proceso de inmunización. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la producción de IFN- $\gamma$  podría ser una herramienta más fiable para valorar la eficacia de la inmunización (sensibilización a la cepa vacunal) mediante cepas vacunales en fases tempranas post-vacunación, dado que las respuestas fueron más homogéneas independientemente de la vía de vacunación.

Por otra parte, las pruebas celulares han sido propuestas como una posible solución a los problemas de interferencia diagnóstica detectados en las pruebas serológicas consecuencia de la vacunación con cepas lisas, como *B. melitensis* Rev. 1 en fases más tardías. En concordancia con lo observado en ganado bovino vacunado con S19 y analizado mediante el test de estimulación linfocitaria (Kaneene *et al.*, 1979), en nuestro estudio la detección de IFN- $\gamma$  detectó un número menor de animales en comparación con lo observado en las pruebas serológicas (aproximadamente el 10% de los animales seguían siendo positivos al IFN- $\gamma$  al final de la experiencia en comparación con más del 40% de reactores a la prueba de RB). Sin embargo, se ha observado que la utilización de otras técnicas basadas en la respuesta inmune celular, como la prueba de la brucelina, está totalmente contraindicada en rebaños que han sido vacunados (Fensterbank, 1985) sugiriendo una cierta interferencia de la vacunación sobre la respuesta inmune celular, por lo que es necesario llevar a cabo más estudios sobre la utilidad de la detección de esta citoquina para la diferenciación de falsos reactores positivos asociados a la vacunación.

Finalmente, los resultados obtenidos en animales infectados experimentalmente con *B. melitensis* H38 (n=14, raza Assaf) demostraron que la producción máxima de IFN- $\gamma$  fue más tardía que la observada en animales vacunados con Rev. 1. Estos resultados pueden deberse a diferencias en la dosis inoculada ( $10^7$  H38 versus  $10^9$  Rev.1) y/o a un estado de inmunosupresión de las ovejas infectadas con H38 ya que estaban preñadas en el momento de la infección, si bien tampoco

puede descartarse un efecto debido a la diferencia en la virulencia de la propia cepa. El máximo número de reactores se observó a los 14 días tras la infección en concordancia con lo observado anteriormente (Jacques *et al.*, 2007). De igual forma, el perfil de producción de IFN- $\gamma$  detectado en las hembras infectadas también siguió el patrón descrito previamente (Durán-Ferrer *et al.*, 2004): se observó un pico en la producción de IFN- $\gamma$  a los 14 días tras la infección correspondiente al estímulo antigénico provocado por la infección de *B. melitensis* y la consecuente bacteriemia. Tras este fenómeno, se observó un descenso de los niveles de IFN- $\gamma$ . Este hecho podría estar relacionado con el acantonamiento de la bacteria en la placenta de las hembras gestantes. Como consecuencia de la infección de *B. melitensis* en los placentomas de las ovejas preñadas se produjo el aborto y con ello un incremento del IFN- $\gamma$  circulante en los días cercanos al mismo, posiblemente consecuencia de una segunda bacteriemia. En concordancia con lo observado por Weynants *et al.*, (Weynants *et al.*, 1995), en un subgrupo de animales se detectó antes la infección por *Brucella* mediante el empleo de pruebas celulares que cuando se emplearon técnicas serológicas, acreditando la posible utilidad de la combinación de técnicas serológicas y celulares para detectar la totalidad de los animales infectados por *B. melitensis*.

En situaciones donde la prevalencia de BOC es alta y/o donde no existen medios económicos para llevar a cabo campañas de diagnóstico y sacrificio de reactores (Alton, 1990), la vacunación en sábana se convierte en la medida de lucha más eficaz para descender los niveles de enfermedad a niveles que permitan la aplicación de otras estrategias de control. El tercer y último trabajo incluido en el segundo capítulo aborda el estudio sobre otra alternativa vacunal a la Rev. 1: el empleo de cepas vacunales rugosas de *B. melitensis* alternativas que permitan superar los principales inconvenientes que limitan la vacunación en sábana en condiciones de campo. Con esta finalidad se estudió la seguridad de la cepa *B. melitensis* B115 en hembras que se encontraban aproximadamente en los 90 días de gestación con el fin de determinar su virulencia residual en hembras gestantes (característica que restringe la aplicación de la Rev. 1 a hembras vacías) (Blasco *et al.*, 1984b; Elberg y Faunce Jr, 1957; Jiménez de Bagues *et al.*, 1989; Ne'eman, 1968a; Zundel *et al.*, 1992).

De las ocho ovejas vacunadas, un total de 5 animales sufrieron un aborto 55-77 días después de la vacunación, poniendo de manifiesto la virulencia de la cepa B115 en hembras gestantes cuando es aplicada en el momento de máxima susceptibilidad. Los abortos ocurrieron en etapas tardías de la gestación comparados con los observados tras la inoculación de Rev. 1 [28-42 días (Ebrahimi *et al.*, 2012)) y 16M (27-51 días, (Durán-Ferrer *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 2007)] sugiriendo una menor patogenicidad de esta cepa B115 comparada con la observada en Rev. 1 y 16M. Estudios anteriores realizados en el modelo murino han demostrado la capacidad de invasión y persistencia de la B115 en el hospedador [la cepa vacunal se recuperó del bazo de ratones inmunizados al menos 60 días después de la inoculación (Adone *et al.*, 2008b)] lo que sugiere, al igual que nuestros resultados, que la virulencia de B115 observada en hembras primíparas no es insignificante. De manera similar a lo observado cuando la Rev. 1 es aplicada en hembras en lactación (Alton y Elberg, 1967), la B115 fue aislada a partir de muestras de flujo vaginal y/o leche en todos los animales vacunados después del aborto, lo que indica un alto riesgo de contaminación ambiental si las hembras son vacunadas durante el periodo de lactación, convirtiéndolas en una fuente de infección para otros animales. De hecho, un animal no vacunado (perteneciente al grupo control, n=3) sufrió un aborto causado por B115, sugiriendo la existencia de un fenómeno de transmisión horizontal de la cepa estudiada a partir de los animales vacunados.

Debido al fenotipo rugoso de B115, el número de reactores a las pruebas RB y CF interpretadas en serie (de acuerdo a los programas españoles de control de BOC) fue mínimo (tan sólo un animal fue positivo en el día 91 de estudio), lo que pone de manifiesto las bondades de la utilización de cepas rugosas en la vacunación contra BOC para evitar los problemas de interferencia diagnóstica tras la vacunación con Rev. 1 (Alton, 1990; Fensterbank *et al.*, 1982a; Garin-Bastuji *et al.* 2006; OIE 2009b). Existen evidencias contradictorias acerca de la posible aparición de falsas reacciones positivas en animales inoculados con B115, ya que aunque algunos autores han observado bajos niveles de anticuerpos frente al LPS de *Brucella* en el suero de animales inoculados con B115 (Cloeckaert *et al.*, 1992b; Jones *et al.*, 1973a; Morgan *et al.* 1966), Jones *et al.* (1973a) no pudieron aislar el LPS en cepas de B115. No obstante, esto no imposibilita que las cepas rugosas como B115 puedan inducir

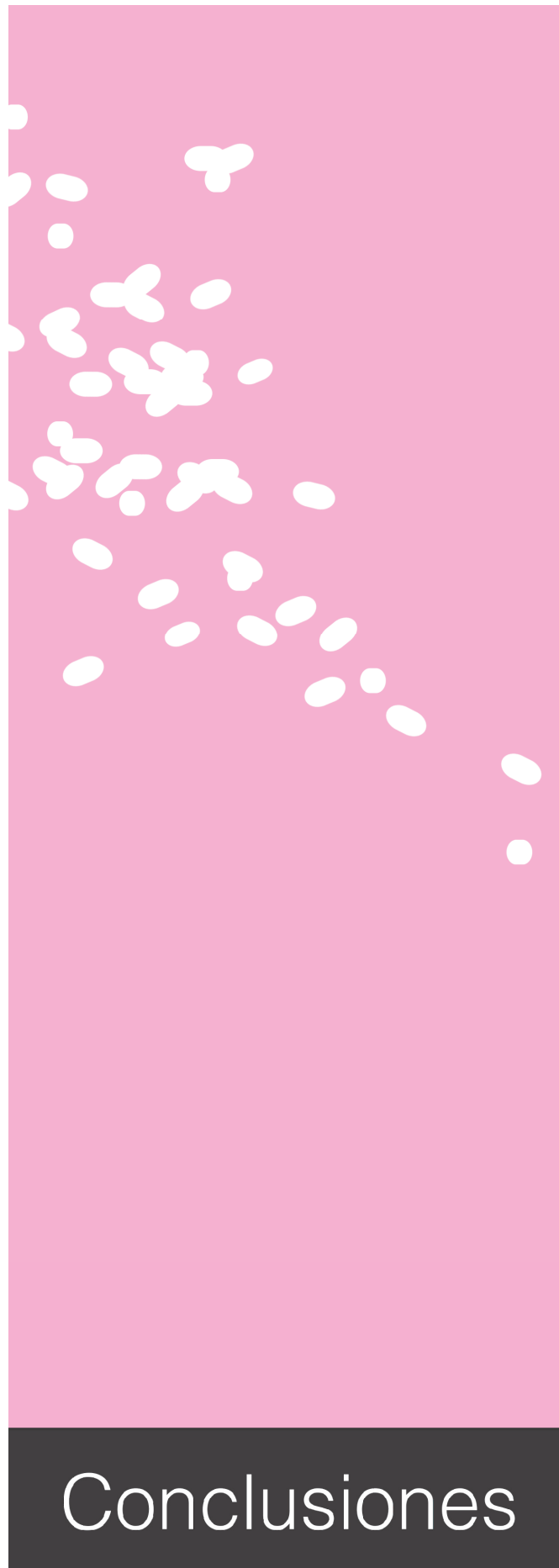
anticuerpos frente a otras componentes del LPS como el núcleo que puedan dar reacción con algunas pruebas serológicas como algunos ELISAs. La relativa inestabilidad de las cepas de *Brucella* en cuanto a su fenotipo se ha observado en algunas ocasiones; así, por ejemplo, se ha demostrado que la cepa vacunal Rev. 1 puede mutar a un fenotipo rugoso, lo que puede acarrear problemas en la eficacia de la vacuna, si no se practican estrictas medidas de manejo (como la conservación de la cadena de frío hasta su inoculación). Por ello se determinó el fenotipo de todos los aislados recuperados de los animales inoculados. La tinción de Cristal Violeta demostró la presencia de un fenotipo rugoso en todos los aislados excepto en cuatro cultivos de una misma oveja vacunada, que presentó una mezcla de bacterias de fenotipo liso y rugoso. Una vez más, las técnicas moleculares aportaron pistas sobre lo acontecido: la técnica MLVA (Le Fleche *et al.*, 2006) determinó el mismo perfil genético en un aislado liso y rugoso, sugiriendo una posible mutación *in vivo* de la cepa B115 de fenotipo rugoso a liso en concordancia con lo observado previamente en *B. abortus* 45/20 (Schurig *et al.*, 2002). A pesar de que también pueden usarse marcadores moleculares para la identificación de las cepas de *Brucella*, como por ejemplo una mutación del gen *wzm* para la identificación de B115 (Adone *et al.* 2011b), nuestro trabajo ha evidenciado la necesidad de evaluar la validez de dichos marcadores en un gran número de cepas (dicha mutación de B115 no se detectó en dos aislados de fenotipo rugoso).

La mayor producción de IFN- $\gamma$  observada cuando se estimuló la sangre de los animales vacunados con antígeno de cepa lisa en comparación con las obtenidas tras la estimulación con antígeno de cepa rugosa podría sugerir un contacto previo con una cepa lisa (consecuencia de la reversión de B115) en algunos de los animales inmunizados. Sin embargo, el bajo número de animales incluidos en el estudio, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la respuesta observada con ambos antígenos y la falta de una evidencia científica que avale esta afirmación hace que esta hipótesis no pueda ser confirmada. El efecto abortivo de la B115 sobre animales preñados en el momento de máxima susceptibilidad parece limitar el empleo de esta cepa en la vacunación en sámana (sin considerar el estado reproductivo de los animales). Por otro lado, es imprescindible realizar más estudios sobre la estabilidad de esta cepa vacunal que valoren su atenuación y capacidad para evitar la inducción de anticuerpos vacunales causantes de interferencias



diagnósticas. De cualquier forma, la eficacia de la B115 contra *B. melitensis* (Adone *et al.*, 2008b) y otras especies de *Brucella* (Adone *et al.*, 2008b; Adone *et al.* 2011a; Adone *et al.* 2012) ha sido demostrada en el modelo murino. Este hecho, unido a los resultados sobre la ausencia de interferencia diagnóstica observada en el presente trabajo abogan por la realización de más estudios sobre la protección inducida por B115 en los pequeños rumiantes como posible alternativa vacunal en aquellas zonas donde se practique la estrategia del diagnóstico y sacrificio de reactores en la lucha contra BOC.





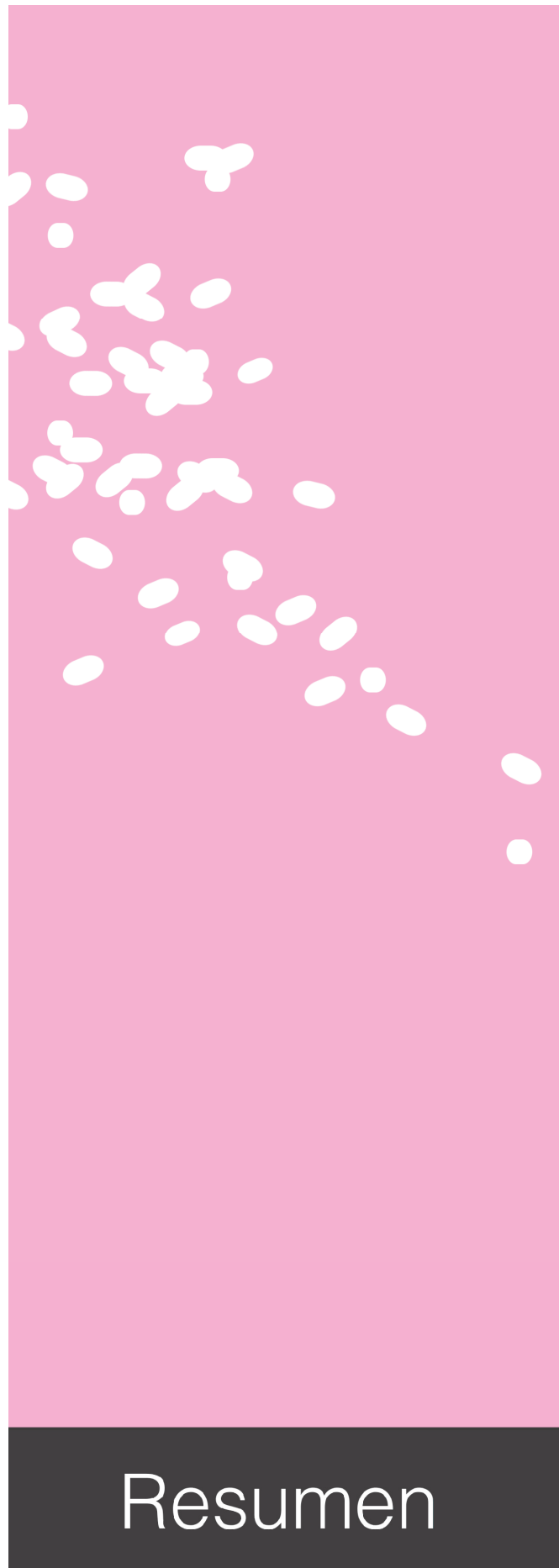


## CONCLUSIONES

1. La técnica LAMP dirigida al fragmento de inserción IS711 es una alternativa a la técnica PCR para la detección específica de ADN de *Brucella* spp. en muestras de ganado ovino, bovino y porcino.
2. Se ha demostrado la utilidad del empleo en paralelo del cultivo en medio Farrel y la técnica LAMP para la detección de animales infectados por *Brucella* spp.
3. La elevada discriminación que ofrece la técnica MLVA-15 confirma su utilidad en estudios epidemiológicos para determinar el origen de los brotes causados por *B. melitensis*.
4. Las tres principales especies zoonóticas de *Brucella* [*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* (biovar 1)] están presentes en los rumiantes domésticos en Egipto, aunque es necesario realizar estudios específicos para evaluar la distribución de cada una de ellas. En el caso de *B. suis* biovar 1, se ha descrito su presencia por primera vez en el ganado bovino en ese país.
5. La vacunación intradérmica de corderas Assaf de 3-6 meses de edad con Rev. 1 induce una respuesta serológica rápida, intensa y más duradera que la vía subcutánea y conjuntival, lo que la hace incompatible con los programas de erradicación aprobados actualmente en España.
6. La técnica del Rosa de Bengala permite la detección de todos los animales infectados experimentalmente con *B. melitensis* a partir de los 21 días tras la infección mientras que la detección del IFN- $\gamma$  permite su detección a partir de los 7 días post-infección. En estos animales la producción de esta citoquina se correlaciona con el momento de la infección y del aborto.
7. El patrón de producción de IFN- $\gamma$  en animales vacunados con Rev. 1 por las vías conjuntival, subcutánea e intradérmica es similar, independientemente de la vía de vacunación.
8. La cepa rugosa B115 de *Brucella melitensis* tiene un efecto abortivo cuando es aplicada por la vía subcutánea en ovejas de la raza Manchega de 12 meses de edad a los 90 días de gestación, lo que desaconseja su utilización en ovejas gestantes. La reversión a un fenotipo liso observada en una oveja inmunizada aconseja la realización de más estudios sobre la estabilidad *in vivo* de esta cepa.

## CONCLUSIONS

1. The LAMP technique targeting the IS711 insertion sequence is an alternative tool to PCR for the specific detection of *Brucella* spp. DNA in samples from ovine, bovine and porcine.
2. The parallel use of culture on Farrel medium and the LAMP technique for detection of *Brucella*-infected animals has been demonstrated to be useful.
3. The high discriminatory power of MLVA-15 technique confirms its usefulness in epidemiological studies for the identification of the origin of outbreaks due to *B. melitensis*.
4. The three main zoonotic *Brucella* species [*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* (biovar 1)] are present in domestic ruminants in Egypt, although further studies are required to assess their distribution. This is the first report of a *B. suis* biovar 1 infection in cattle in that country.
5. Intradermic vaccination of 3-6 months Assaf ewes using Rev. 1 induces a fast, intense and more long-lasting serologic response than the subcutaneous and conjunctival routes, making it incompatible with the eradication campaigns currently in place in Spain.
6. Use of the Rose Bengal Test allows the detection of all *B. melitensis* experimentally infected animals from 21 days after challenge onwards, while an IFN- $\gamma$  assay detected them as soon as 7 days post-infection. In these animals, the production of this cytokine and the infection and abortion moments are correlated.
7. The IFN- $\gamma$  production pattern in Rev. 1 vaccinated animals by the conjunctival, subcutaneous and intradermal routes is similar regardless the route of vaccination.
8. Vaccination subcutaneously at midpregnancy with the rough *Brucella melitensis* B115 strain resulted in abortion in 12 months Manchega ewes, advising against its use in pregnant ewes. The observed reversion to the smooth phenotype observed in one immunized ewe highlights the need of further studies to determine the *B. melitensis* B115 *in vivo* stability.







## RESUMEN

Durante más de 100 años la lucha contra la brucelosis ovina y caprina (BOC) ha tenido como objetivo el control y posterior erradicación de esta importante zoonosis que afecta de manera dramática a la producción animal. El control de BOC se apoya fundamentalmente en dos grandes pilares (además de estrictas medidas de bioseguridad): la vacunación con Rev. 1 y el sacrificio de animales seropositivos. No obstante, existen limitaciones importantes que han dificultado el éxito de la aplicación de estas estrategias en ciertas situaciones epidemiológicas. Aunque el aislamiento del patógeno sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico directo de la enfermedad, sus numerosas limitaciones prácticas (en términos de equipamiento, personal y rendimiento) han motivado el desarrollo en los últimos años de las técnicas de detección molecular. Adicionalmente, los métodos moleculares permiten además la caracterización de los aislados de *B. melitensis*, convirtiéndose en una herramienta útil en estudios epidemiológicos. La Rev. 1 es la opción más adecuada disponible actualmente para la inmunización frente a BOC aunque su aplicación en el campo está limitada por algunos de los inconvenientes asociados a esta vacuna (como la interferencia diagnóstica causada por los anticuerpos vacunales en las pruebas diagnósticas tradicionales y su virulencia residual) que han restringido su aplicación en el campo. En este contexto, el desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico y prevención de *B. melitensis* puede constituir una herramienta importante para el control de este patógeno en los pequeños rumiantes.

El primer capítulo de la presente tesis incluye tres estudios que ponen de manifiesto la utilidad de las técnicas moleculares en las campañas de control de la brucelosis de los rumiantes. El primer estudio describe el desarrollo y puesta a punto de una nueva técnica de amplificación isotérmica LAMP (*Loop-mediated amplification*) basada en el fragmento de copia múltiple IS711. La utilidad de dicha LAMP-IS711 para la detección de *Brucella* spp. se evaluó en un panel de 88 muestras (procedentes mayoritariamente de ovejas y en menor medida de bovino y porcino), ofreciendo resultados comparables a los obtenidos mediante PCR en

tiempo real y bacteriología. Estos resultados evidencian el valor de la LAMP-IS711 como una técnica complementaria al cultivo, de especial utilidad en muestras con alta carga bacteriana, como aquéllas provenientes de fetos resultantes de fallos reproductivos. El segundo y tercer trabajo del primer capítulo demuestran la utilidad de la técnica de caracterización molecular MLVA en dos escenarios epidemiológicos. El primer estudio se centró en la identificación y caracterización de cepas de *Brucella* aisladas de rumiantes domésticos procedentes de diferentes regiones de Egipto (donde *B. melitensis* es endémica a pesar de los esfuerzos invertidos en su control). La técnica MLVA evidenció la existencia de una gran diversidad genética en los aislados de *B. melitensis* recuperados en las especies de abasto. Los aislados de *B. melitensis* (n=13) resultaron estar filogenéticamente relacionadas con cepas identificadas en Túnez y Argelia, poniendo de manifiesto una posible conexión (como flujos de animales). Además, se demostró la circulación de otras dos especies zoonóticas de *Brucella*, *B. abortus* y *B. suis* biovar 1 (que hasta la fecha nunca había sido descrita en ganado bovino en Egipto), sugiriendo la potencial implicación de otras especies además de *B. melitensis* en la epidemiología de la brucelosis en Egipto. El segundo estudio demostró la utilidad de las técnicas de caracterización en la investigación sobre el origen de un brote de *B. melitensis* que afectó a cuatro explotaciones de ganado bovino (más de 2.000 vacas) epidemiológicamente relacionadas y a siete personas. La técnica MLVA demostró la existencia de cuatro perfiles genéticos diferentes en aislados recogidos de personas, vacas y una oveja (posible reservorio origen del brote), si bien se encontraron perfiles idénticos en más de una especie, apuntando a una transmisión interespecifica. Además, las diferencias en los perfiles se debieron a cambios en dos *loci* considerados hipervariables, sugiriendo por tanto la implicación de una única cepa de *B. melitensis* que habría mutado durante el transcurso del brote, y permitiendo así trazar el origen del mismo.

El segundo capítulo de esta tesis aborda el estudio de nuevas aproximaciones para la inmunización frente a *B. melitensis* en el ganado ovino, bien a través de la valoración de una estrategia alternativa para la aplicación de la Rev. 1 o bien mediante la evaluación de la cepa B115 como vacuna para la inmunización de ovejas preñadas. El primer trabajo consistió en la evaluación de la idoneidad de la vía intradérmica para la vacunación con Rev. 1 y su potencial utilidad en las campañas

de erradicación actualmente aplicadas en España (vacunación restringida a corderas y sacrificio de animales adultos seropositivos). La utilidad de la vacunación intradérmica, demostrada frente a otros patógenos, y la posibilidad de usar dispositivos automáticos sin agujas que permitan la vacunación rápida y segura de un gran número de animales son algunas de las razones que motivaron el estudio. La vacunación por la vía intradérmica desencadenó una respuesta serológica rápida, intensa y duradera detectada en 64 animales por todas las técnicas utilizadas en el estudio. Considerando este hecho, esta vía de inmunización podría constituir una alternativa interesante para aquellas regiones donde no se apliquen los programas de sacrificio de animales adultos reactivos, si bien sería incompatible con éstos. Con el fin de evaluar la protección inducida por la vacunación con Rev. 1 por la vía intradérmica, se realizó una infección experimental con *B. melitensis* 53H38 durante el último tercio de gestación en ovejas Assaf primíparas (n=87). Los resultados fueron comparados con los obtenidos tras la infección experimental de ovejas preñadas previamente inmunizadas por las vías conjuntival y subcutánea. Aunque no se observaron diferencias significativas en la protección registrada en los diferentes grupos vacunales (incluidos los dos de referencia, SC y CJ) el alto porcentaje de abortos registrado en los animales vacunados (>70%) afecta severamente la validez externa del estudio e impide la valoración de la eficacia de la vacunación intradérmica. Entre los factores que podrían haber estado relacionados con la baja protección inducida por Rev. 1 en este estudio se incluyen la susceptibilidad a la infección por *B. melitensis* asociada a las razas de producción láctea, el gran número de gestaciones múltiples observadas y la exposición a otros patógenos abortifacientes. No obstante, la realización de estudios específicos sobre el posible impacto de éstos, y posiblemente otros factores no considerados, sobre las consecuencias del desafío experimental observadas en animales vacunados en este estudio sería necesaria con el fin de valorar la relevancia de las observaciones aquí descritas.

El segundo estudio de este capítulo aborda la evaluación de la respuesta inmune celular frente a *B. melitensis* en animales vacunados mediante la comparación con los patrones observados en animales no expuestos y en animales infectados experimentalmente. La información sobre la dinámica de producción de IFN- $\gamma$  (principal citoquina involucrada en la respuesta inmune frente *Brucella*) podría

aclarar diferentes aspectos de la patogenia de *Brucella* (como la interacción bacteria-hospedador), así como contribuir al diseño de nuevos métodos de diagnóstico de BOC. El estudio se centró en tres contextos epidemiológicos que pueden estar presentes en un programa de lucha contra BOC: animales no expuestos a *Brucella* spp., ovejas de 3-6 meses de edad vacunadas con Rev. 1 y animales infectados con *B. melitensis*. Las reacciones inespecíficas observadas en animales no expuestos a *Brucella* limitan la utilidad de esta técnica en ovejas menores de un año. A diferencia de lo observado en las pruebas serológicas, no se observaron diferencias significativas en la producción de IFN- $\gamma$  entre los animales vacunados por distintas vías (intradérmica, subcutánea y conjuntival) después de 14 días tras la inmunización independientemente de la ruta de vacunación empleada, sugiriendo que esta técnica podría ser una estrategia eficaz para monitorizar la respuesta post-vacunal. Por su parte, se observó una posible asociación entre la producción de esta citoquina y el fallo reproductivo asociado a la infección por *B. melitensis* en animales infectados experimentalmente, indicando que esta aproximación diagnóstica podría tener valor para la monitorización de la infección y la predicción del fallo reproductivo producido por este patógeno.

El último estudio de esta tesis tuvo como objetivo la evaluación de la cepa B115 de *B. melitensis* como una posible alternativa a la Rev. 1 para la inmunización frente a BOC. Se observó un fallo reproductivo en cinco de los ocho animales inmunizados con B115. Además se demostró la transmisión horizontal de la cepa vacunal entre un animal vacunado y un control, poniendo en duda la potencial utilidad de esta cepa para la vacunación de ovejas gestantes. Sin embargo, el escaso porcentaje de reactivos (tan sólo un animal en el día 91 del experimento) a las pruebas RB-FC en paralelo demuestra la posible utilidad de esta cepa rugosa para evitar los problemas de interferencia diagnóstica asociados a la vacunación con Rev. 1. Sin embargo, y considerando que se observó un fenómeno de reversión a fenotipo liso en un animal inmunizado, es necesario realizar más estudios que demuestren su estabilidad *in-vivo* antes de plantear su potencial utilidad en la inmunización frente a BOC en ovejas y cabras.

## SUMMARY

In the last 100 years the battle against Small Ruminant Brucellosis (SRB) has been focused on the control and eventual eradication of this important zoonosis, which has a dramatic impact in animal production. The control of SRB is based on vaccination with Rev. 1 and/or test-and-slaughter programs (in addition of strict biosafety measures). However, there are important drawbacks in both strategies which have led to their limited success in certain epidemiological situations. Limitations associated with *B. melitensis* isolation (considered the gold standard technique for confirmation of *Brucella* infection) have in great part been overcome by the use of molecular techniques that have emerged in the last years. Molecular methods permit also the characterization of *B. melitensis* isolates, what renders them a useful tool in epidemiological studies of SRB. Rev. 1, currently the best available vaccine against SRB, has several disadvantages (e.g. diagnostic interferences due to vaccine antibodies and residual virulence). In this context, research on new strategies for the diagnosis and prevention of *B. melitensis* infection is considered an important tool for the control of this pathogen in small ruminants.

The first chapter of this thesis includes three studies on the efficacy of molecular techniques applied for the detection and characterization of *B. melitensis* in the framework of control campaigns against animal brucellosis. The first study describes the development of a new isothermal LAMP (Loop-mediated amplification) technique based on the multiple copy insertion sequence IS711. The technique was assayed in a panel of 88 clinical samples (mostly recovered from sheep but also from cows and sows) and yielded similar results to those obtained using real time PCR and culture. These results demonstrate the suitability of IS711-LAMP as a complementary tool to bacteriology especially for highly contaminated samples such as specimens recovered from abortions. The other two studies focused on molecular characterization of *Brucella* spp. by MLVA in two different epidemiological scenarios. The first work aimed to the identification and characterization of *Brucella* strains recovered from domestic ruminants isolated from different regions of Egypt (where *B. melitensis* is endemic in spite of the efforts for its control). In this case, MLVA was able to reveal a large genetic diversity among the *B. melitensis* isolates studied. Moreover,

13 isolates were shown to be genetically related to strains recovered from Tunisia and Algeria, indicating a possible epidemiological link (such as animal movement). In addition, the presence of two other zoonotic *Brucella* species, *B. abortus* and *B. suis* biovar 1 (in the first description of this species in cattle in Egypt) was demonstrated, suggesting a potential involvement of different *Brucella* species in the epidemiology of animal brucellosis in the country. The second work demonstrates the usefulness of molecular characterization in the investigation of a *B. melitensis* outbreak that affected more than 2,000 cattle and seven people. MLVA revealed the presence of four different genetic profiles among the *B. melitensis* isolates recovered from cattle, humans and one sheep (species suspected to act as reservoir of the pathogen), but also shared profiles on isolates from different species indicating the occurrence of interspecies transmission. The differences observed between the MLVA profiles were due to variation in two *loci* (considered as hypervariable) suggesting that the infection could have been caused by only single *B. melitensis* strain that mutated during the course of the outbreak.

The second chapter of this thesis focuses on new approaches regarding vaccination against *B. melitensis* in sheep, first by assessing the efficacy of alternative routes of administration of Rev. 1 vaccine and second by evaluating the use of strain B115 as a potential candidate for the immunization of pregnant sheep. The first study was aimed at assessing the suitability of the intradermic route for the administration of Rev. 1 vaccine and for the evaluation of its potential implementation in the SRB eradication program in place in Spain (vaccination restricted to 3-6 months sheep and test-and-slaughter campaigns). The usefulness of the intradermic vaccination for immunization against other pathogens and the potential use of automatic needle-free devices that could lead to a quick and safe vaccination of a large number of animals are reasons triggering the present study. The intradermic vaccination induced a prompt, intense and long-lasting post-vaccination serologic response detected in 64 sheep using all studied techniques. Considering this fact, intradermic vaccination may be a valuable alternative for immunization with Rev. 1 in those regions where a test-and-slaughter strategy is not implemented, but would be incompatible with such an approach. In order to assess the protection induced by intradermal Rev. 1 vaccination, Assaf pregnant primiparous ewes (n=87) were challenged with *B. melitensis* 53H38 at midpregnancy. Results were compared with those observed after

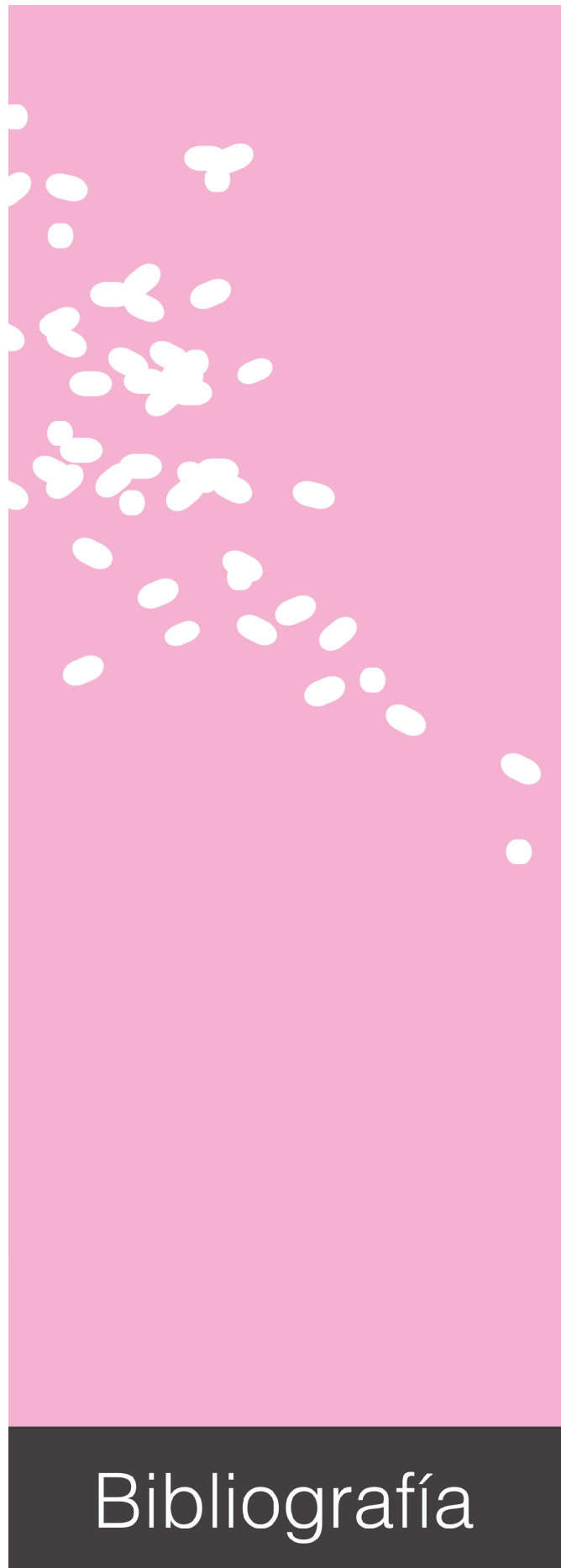
experimental infection of ewes previously vaccinated by classical routes (subcutaneous and conjunctival). After infection, the proportion of abortions observed among vaccinated animals was high (>70%). No significant differences were observed among vaccinated groups (included references ones, SC and CJ). However, the large proportion of abortions observed in all vaccinated groups affects the external validity of the study and thus prevents the assessment of the effectiveness of the ID vaccination. Several factors [such as the higher susceptibility to *Brucella* infection observed in dairy breeds, the occurrence of twin/triplet gestations and the exposure to other infectious pathogens (as *Chlamydia abortus*)] may be associated with these results. However, further studies designed specifically to assess the impact of these factors in the protection conferred by Rev. 1 vaccination would be needed to fully evaluate the relevance of these observations.

The aim of the second work included in the present chapter was the study of the cellular immune response against *B. melitensis* in vaccinated animals and its comparison of that observed in naïve and experimentally infected sheep. Information about the production of IFN- $\gamma$  (the main cytokine involved in the cellular immune response against *Brucella*) could help to understand the bacterial-host interaction that leads to its intracellular survival, and could be useful for the design of new diagnostic approaches. The study was focused on three epidemiological scenarios that could be found in the frame of an eradication program: naïve animals, 3-6 months Rev. 1 vaccinated ewes and pregnant sheep experimentally infected with *B. melitensis*. Unspecific reactions were observed in naïve sheep of less than one year of age, what may question the suitability of this technique for this age class. In contrast with the observed serological response, no significant differences in the IFN- $\gamma$  production was observed between vaccinated groups (intradermal, subcutaneous and conjunctival) after 14 days post-vaccination using Rev. 1 suggesting this technique could be a potential tool for monitoring post-vaccination response. The IFN- $\gamma$  levels seemed to be influenced by the moment of abortion, indicating IFN- $\gamma$  detection in pregnant ewes could be useful for monitoring the infection and predict eventual reproductive failures.

The last study in this thesis aimed to assess the use of *B. melitensis* B115 strain as a possible alternative to Rev. 1 for immunization of sheep against brucellosis.



Five of the eight B115 vaccinated ewes aborted. Moreover, a horizontal transmission of the vaccine strain was observed, thus questioning the suitability of B115 strain to immunize pregnant sheep. However, the low percentage of reactors (only one reactor 91 days after vaccination) to RBT and CFT (serial interpretation) further supports the potential of rough strains as DIVA candidates. However, considering the rough to smooth reversion observed in one immunized sheep, further studies to demonstrate its genetic stability *in vivo* conditions would be needed.





- Abbas B y Agab H (2002) A review of camel brucellosis. *Prev Vet Med* 55:47-56.
- Abdoel T, Dias IT, Cardoso R y Smits HL (2008) Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock. *Vet Microbiol*.
- Abramson JH (2004) WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 1:6.
- Abuharfeil N, Abo-Shehada y M.N. (1998) A comparison between three serological tests for *Brucella melitensis* infection in sheep. *Tr J of Veterinary and Animal Sciences* 22:119-122.
- Acha PNSB. (2003) Brucellosis. *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Bacterioses and mycoses*. pp.40-46.
- Adams LG (2002) The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet Microbiol* 90:553-561.
- Adone R, Ciuchini F, Marianelli C *et al.* (2005) Protective properties of rifampin-resistant rough mutants of *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 73:4198-4204.
- Adone R, Francia M y Ciuchini F (2008a) *Brucella melitensis* B115-based complement fixation test to detect antibodies induced by *Brucella* rough strains. *J Appl Microbiol* 105:567-574.
- Adone R, Francia M y Ciuchini F (2008b) Evaluation of *Brucella melitensis* B115 as rough-phenotype vaccine against *B. melitensis* and *B. ovis* infections. *Vaccine* 26:4913-4917.
- Adone R, Francia M, Pistoia C, Pesciaroli M y Pasquali P (2011a) *B. melitensis* rough strain B115 is protective against heterologous *Brucella* spp. infections. *Vaccine* 29:2523-2529.
- Adone R, Muscillo M, La RG, Francia M y Tarantino M (2011b) Antigenic, immunologic and genetic characterization of rough strains *B. abortus* RB51, *B. melitensis* B115 and *B. melitensis* B18. *PLoS ONE* 6:e24073.
- Adone R, Francia M, Pistoia C *et al.* (2012) Protective role of antibodies induced by *Brucella melitensis* B115 against *B. melitensis* and *Brucella abortus* infections in mice. *Vaccine* 30:3992-3995.
- Adone R y Pasquali P (2013) Epidemiological surveillance of brucellosis. *Rev Sci Tech* 32:199-205.
- Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H y Frangoulidis D (2003) Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab* 49:487-505.

- Al Dahouk S, Neubauer H, Hensel A *et al.* (2007) Changing epidemiology of human brucellosis, Germany, 1962-2005. *Emerg Infect Dis* 13:1895-1900.
- Al Dahouk S, Nockler K, Hensel A *et al.* (2005) Human brucellosis in a nonendemic country: a report from Germany, 2002 and 2003. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:450-456.
- al-Khalaf SA, Mohamad BT y Nicoletti P (1992) Control of brucellosis in Kuwait by vaccination of cattle, sheep and goats with *Brucella abortus* strain 19 or *Brucella melitensis* strain Rev. 1. *Trop Anim Health Prod* 24:45-49.
- Al-Mariri A, Ramadan L y Akel R (2011) Assessment of milk ring test and some serological tests in the detection of *Brucella melitensis* in Syrian female sheep. *Trop Anim Health Prod* 43:865-870.
- Al-Shamakh I (1995) A brief review of the national project for the control of brucellosis in the Kingdom of Saudi Arabia. *CNVA*.
- Alavi Shoushtari.S.M, Zeinali A (1995) Responses of female lambs to Rev-1 (brucellosis) vaccination. *Prev Vet Med* 21:289-297.
- Ali Kojouri G y Gholami M (2009) Post vaccination follow-up of *Brucella melitensis* in blood stream of sheep by PCR assay. *Comparative Clinical Pathology* 18:439-442.
- Allen CA, Adams LG y Ficht TA (1998) Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* 66:1008-1016.
- Alonso-Urmeneta B, Moriyón I, Díaz R y Blasco JM (1988) Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 26:2642-2646.
- Alonso-Urmeneta B, Marin C, Aragón V *et al.* (1998) Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:749-754.
- Alton GG (1959) Brucellosis in Malta. II. *Br Vet J* 115:251-260.
- Alton GG (1966) Duration of the immunity produced in goats by the Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. *J Comp Pathol* 76:241-253.
- Alton GG (1967) Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. Serological reactions in Maltese goats. *J Comp Pathol* 77:327-329.
- Alton GG y Elberg SS (1967) Rev. 1 *Brucella melitensis* Vaccine. A review of ten years of study. *Veterinary Bulletin* 37:793-800.

- Alton GG, Elberg SS y Crouch D (1967) Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. The stability of the degree of attenuation. J Comp Pathol 77:293-300.
- Alton GG (1968) Further studies on the duration of the immunity produced in goats by the Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. J Comp Pathol 78:173-178.
- Alton GG (1969a) A trial in guinea-pigs of four methods of vaccination against *Brucella melitensis* infection. Res Vet Sci 10:329-331.
- Alton GG (1969b) Vaccination of guinea-pigs with rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. The response to very large and very small doses. Res Vet Sci 10:326-328.
- Alton GG (1970) Vaccination of goats with reduced doses of Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. Res Vet Sci 11:54-59.
- Alton GG (1971) Standardization of agglutinating antigens for the diagnosis of brucellosis. Res Vet Sci 12:330-337.
- Alton GG, Jones LM, García-Carrillo C y Trenchi A (1972) *Brucella melitensis* Rev. 1 and *Brucella abortus* 45-20 vaccines in goats: immunity. Am J Vet Res 33:1747-1751.
- Alton GG, Fensterbank R y Plommet AM (1984) La brucellose de la chevre. In: Yvoré P and Perrin G (eds), Les maladies de la chèvre.
- Alton GG (1985a) Rev. 1 and H38 *Brucella melitensis* vaccines. In: Verger J and Plommet M (eds), *Brucella melitensis* pp. 215-227. Martinus Nijhoff, Dordrecht/Boston/Lancaster.
- Alton GG (1985b) The epidemiology of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. In: Verger JM and Plommet M (eds), *Brucella melitensis* pp. 187-196. Martinus Nijhoff.
- Alton GG (1987) Control of *Brucella melitensis* infection in shee and goats- a review. Trop Anim Health Prod 19:65-74.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD y Verger JM. (1988) Techniques for the brucellosis laboratory. Inra Publications, Paris, France.
- Alton GG (1990) *Brucella melitensis*. In: Duncan JR and Nielsen K (eds), Animal Brucellosis pp. 383-409. Boston.
- Álvarez J, Sáez JL, García N *et al.* (2010) Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain. Res Vet Sci.
- Amin AS, Hamdy ME y Ibrahim AK (2001) Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. Vet Microbiol 83:37-44.

- Anderson TD, Meador VP y Cheville NF (1986) Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. Vet Pathol 23:219-226.
- Anon (2000) OIE Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccine for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4. Bovine Brucellosis. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties pp. 359-370.
- Anon (2006) Scientific opinion on performances of brucellosis diagnostic methods for bovines, sheep and goats. The EFSA Journal 432:1-44.
- Aragón V, Díaz R, Moreno E and Moriyón I (1996) Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. J Bacteriol 178:1070-1079.
- Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A y Mayorga LS (2000) Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. Infect Immun 68:4255-4263.
- Ariza J, International Society of Chemotherapy and Institute of Continuing Medical Education of Ioannina. (2007) Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. PLoS Med 4:317.
- Arroyo C, I, López Rodríguez MJ, Sapina AM, López LA y Sacristán AR (2006) Probable transmission of brucellosis by breast milk. J Trop Pediatr 52:380-381.
- Ávila-Calderón ED, López-Merino A, Jain N *et al.* (2012) Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. Clin Dev Immunol 2012:352493.
- Avila-Calderon ED, Lopez-Merino A, Sriranganathan N, Boyle SM y Contreras-Rodriguez A (2013) A history of the development of *Brucella* vaccines. Biomed Res Int 2013:743509.
- Bachrach G, Banai M, Bardenstein S *et al.* (1994) *Brucella* ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of brucellin INRA for delayed-type hypersensitivity in *Brucella*-sensitized guinea pigs. Infect Immun 62:5361-5366.
- Baily GG, Krahn JB, Drasar BS y Stoker NG (1992) Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J Trop Med Hyg 95:271-275.
- Baldwin CL y Goenka R (2006) Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? Crit Rev Immunol 26:407-442.

- Banai M, Abramson M, Mayer I *et al.* (1995) Problems associated with the persistence and possible horizontal transfer of *Brucella melitensis* Rev. 1 in connection with serological surveillance in Israel. FAO/WHO/OIE Round Table on the Use of Rev. 1 Vaccine in Small Ruminants and Cattle, 69-76. 1995. CNEVA, Alfort, France.
- Banai M (2002) Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. Vet Microbiol 90:497-519.
- Bang B (1906) Infectious abortion in cattle. J Comp Pathol 19:191-202.
- Barakat A, El Fadaly H, Shaapan R y Khalil A (2011) Occupational Health Hazard of Egyptian Employees in Contact with Wastage Nourished Swine. Journal of American Science 7:808-813.
- Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht TA, Baum M y Banai M (2002) Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the *PstI* site polymorphism of its *omp2* gene. J Clin Microbiol 40:1475-1480.
- Barrio MB, Grillo MJ, Munoz PM *et al.* (2009) Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. Vaccine 27:1741-1749.
- Baum M, Zamir O, Bergman-Rios R *et al.* (1995) Comparative evaluation of microagglutination test and serum agglutination test as supplementary diagnostic methods for brucellosis. J Clin Microbiol 33:2166-2170.
- Benkirane A (2006) Ovine and caprine brucellosis: world distribution and control/eradication strategies in West Asia/North Africa region. Small Ruminant Research 62:19-25.
- Bercovich Z, Haagsma J, van Lipzig JH y Taaijke R (1993) Specificity of the skin delayed-type hypersensitivity test in brucellosis free cattle tested with a *Brucella* allergen. Zentralbl Veterinarmed B 40:582-588.
- Bergey DH y Holt J. (1994) Bergey's manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, MD, USA.
- Bettelheim KA, Maskill WJ y Pearce J (1983) Comparison of standard tube and microagglutination techniques for determining *Brucella* antibodies. J Hyg (Lond) 90:33-39.
- Bhattacharjee AK, Izadjoo MJ, Zollinger WD, Nikolich MP y Hoover DL (2006) Comparison of protective efficacy of subcutaneous versus intranasal



- immunization of mice with a *Brucella melitensis* lipopolysaccharide subunit vaccine. Infect Immun 74:5820-5825.
- Bhattacharjee AK, Van d, V, Izadjoo MJ *et al.* (2002) Protection of mice against brucellosis by intranasal immunization with *Brucella melitensis* lipopolysaccharide as a noncovalent complex with *Neisseria meningitidis* group B outer membrane protein. Infect Immun 70:3324-3329.
- Biancifiori F, Nannini D, Di MA y Belfiore P (1996) Assessment of an indirect ELISA in milk for the diagnosis of ovine Brucellosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 19:17-24.
- Biancifiori F, Garrido F, Nielsen K *et al.* (2000) Assessment of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA) for diagnosis of brucellosis in infected and Rev. 1 vaccinated sheep and goats. New Microbiol 23:399-406.
- Blasco JM, Díaz R, Moriyón I y Salvo MD (1984a) Evaluation of a radial immunodiffusion test for diagnosing brucellosis in sheep and its possible value for differentiating infected from *Brucella melitensis* Rev 1 vaccinated sheep. Developments in Biological Standardization 56:507-511.
- Blasco JM, Estrada A y Mercadal M (1984b) A note on adult sheep vaccination with reduced dose of *Brucella melitensis* Rev 1. Ann Rech Vet 15:553-556.
- Blasco JM, Marín CM, Barberán M, Moriyón I y Díaz R (1987) Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. Vet Microbiol 14:381-392.
- Blasco JM (1990) *Brucella ovis*. In: Nielsen & Duncan (ed), Animal Brucellosis pp. 352-378. Boca Ratón.
- Blasco JM y Díaz R (1993) *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. Lancet 342:805.
- Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marín CM *et al.* (1994a) Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Vet Rec 134:415-420.
- Blasco JM, Marín C, Jiménez de BM *et al.* (1994b) Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. J Clin Microbiol 32:1835-1840.
- Blasco JM (1997) A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. Prev Vet Med 31:275-283.

- Blasco JM (2004) Estado Actual de la Brucelosis en España. Profesión Veterinaria 15:22-34.
- Blasco JM (2006) Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. Small Ruminant Research 62:33-37.
- Blasco JM (2010a) Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Prilozi 31:145-165.
- Blasco JM (2010b) Situación actual y perspectivas futuras de erradicación de la brucelosis ovina y caprina (BOC) en España (I). Tierras-Ganadería:30-39.
- Blasco JM (2010c) Situación actual y perspectivas futuras de erradicación de la brucelosis ovina y caprina (BOC) en España (II). Tierras-Ganadería:74-83.
- Blasco JM y Molina-Flores B (2011) Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Vet Clin North Am Food Anim Pract 27:95-104.
- Borts IH, McNutt SH y Jordan CF (1946) *Brucella melitensis* isolated from swine tissues in Iowa. J Am Med Assoc 130:966.
- Bosnakovski J, Mitrov D y Naletoski I (2010) Diagnostic validation of ovine and caprine brucellosis using serum- and milk-elisa. Prilozi 31:103-115.
- Bosseray N (1991) *Brucella melitensis* Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. Biologicals 19:355-363.
- Bosseray N (1992) Control methods and thresholds of acceptability for antibrucella vaccines. Dev Biol Stand 79:121-128.
- Bosseray N y Plommet M (1990) *Brucella suis* S2, *Brucella melitensis* Rev. 1 and *Brucella abortus* S19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three *Brucella* species challenge strains in mice. Vaccine 8:462-468.
- Bounaadja L, Albert D, Chenais B *et al.* (2009) Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, *bcs31* and *per* target genes. Vet Microbiol 137:156-164.
- Bouza E, Sánchez-Carrillo C, Hernangómez S y González MJ (2005) Laboratory-acquired brucellosis: a Spanish national survey. J Hosp Infect 61:80-83.
- Bowden RA, Verger JM, Grayon M, Limet JN y Dubray G (1993) Simultaneous expression of smooth and rough phase properties related to lipopolysaccharide in a strain of *Brucella melitensis*. J Med Microbiol 39:363-370.

- Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Bernard S y Dubray G (1995) Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun* 63:3945-3952.
- Bricker BJ y Halling SM (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 32:2660-2666.
- Bricker BJ (2002) PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 90:435-446.
- Bricker BJ, Ewalt DR y Halling SM (2003) *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol* 3:15.
- Bruce D (1887) Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. *Practitioner* 39:161.
- Buddle MB (1956) Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J Hyg (Lond)* 54:351-364.
- Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Gidney MAJ *et al.* (1989) Definition of brucella-A and brucella-M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infection and Immunity* 57:2829-2836.
- Burgess GW, Spencer TL y Norris MJ (1985) Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. *Aust Vet J* 62:262-264.
- Burriel A, Christodouloupoulod G, Bisias G y Fthenakis G (2004) Comparison of fluorescence polarization assay, indirect ELISA and competitive ELISA methods for diagnosis of *Brucella melitensis*-infection in small ruminants. *Small Ruminant Research* 54:243-247.
- Buyukcangaz E, Sen A, Carli KT y Kahya S (2011) Comparison of direct culture versus PCR for the detection of *Brucella* in aborted fetuses of cattle and sheep in Turkey. *Vet Rec* 168:430.
- Buyuktanir O, Genc O, Celebi O y Yurdusev N (2012) Rapid immunofiltration assay as a field diagnostic tool for ovine brucellosis. *J Immunoassay Immunochem* 33:35-47.
- Capasso L (1999) Brucellosis at Herculaneum. *Journal of Osteoarchaeology* 9:277-288.
- Capasso L (2002) Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J Infect* 45:122-127.

- Cardoso PCG, Macedo GC, Azevedo V y Oliveira SC (2006) *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial Cell Factories 5.
- Carlsson HE, Hurvell B y Lindberg AA (1976) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for titration of antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica*. Acta Pathol Microbiol Scand C 84:168-176.
- Carmichael LE y Bruner DW (1968) Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. Cornell Vet 48:579-592.
- Caroff M, Bundle DR, Perry MB, Cherwonogrodzky JW y Duncan JR (1984) Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. Infect Immun 46:384-388.
- Casañas MC, Queipo-Ortuno MI, Rodríguez-Torres A *et al.* (2001) Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20:127-131.
- Cassataro J, Velikovsky CA, Giambartolomei GH *et al.* (2002) Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant ribosome recycling factor-homologous protein and its cDNA. Vaccine 20:1660-1669.
- Cassataro J, Velikovsky CA, de la Barrera S *et al.* (2005) A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. Infect Immun 73:6537-6546.
- Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM *et al.* (2007) A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from *Omp31* to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. Vaccine 25:4437-4446.
- Celli J, de CC, Franchini DM *et al.* (2003) *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J Exp Med 198:545-556.
- Cetinkaya B, Ongor H, Muz A *et al.* (1999) Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. Vet Rec 144:239-240.
- Chain PS, Comerci DJ, Tolmasky ME *et al.* (2005) Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. Infect Immun 73:8353-8361.
- Chand P, Sadana JR y Malhotra AK (2002) Epididymo-orchitis caused by *Brucella melitensis* in breeding rams in India. Vet Rec 150:84-85.

- Chand P, Sadana JR, Malhotra AK y Poonia JS (2004) Indirect ELISA for the detection of antibodies to *Brucella melitensis* in sheep milk. *Vet Rec* 155:639-641.
- Chand P, Rajpurohit BS, Malhotra AK y Poonia JS (2005) Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet Microbiol* 108:305-311.
- Chen S, Li X, Li J y Atwill ER (2013) Rapid detection of *Brucella* spp. using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Methods Mol Biol* 1039:99-108.
- Cheville NF, Jensen AE, Halling SM *et al.* (1992) Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 53:1881-1888.
- Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE *et al.* (1996a) Bacterial persistence and immunity in goats vaccinated with a *purE* deletion mutant or the parental 16M strain of *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 64:2431-2439.
- Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE *et al.* (1996b) Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am J Vet Res* 57:1153-1156.
- Christopher S, Umapathy BL y Ravikumar KL (2010) Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *J Lab Physicians* 2:55-60.
- Cloeckaert A, de WP, Dubray G y Limet JN (1990) Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* 58:3980-3987.
- Cloeckaert A, Jacques I, Bosseray N *et al.* (1991) Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*. *J Med Microbiol* 34:175-180.
- Cloeckaert A, Jacques I, de WP, Dubray G y Limet JN (1992a) Protection against *Brucella melitensis* or *Brucella abortus* in mice with immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM monoclonal antibodies specific for a common epitope shared by the *Brucella* A and M smooth lipopolysaccharides. *Infect Immun* 60:312-315.
- Cloeckaert A, Zygmunt MS, Nicolle JC, Dubray G y Limet JN (1992b) O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *J Gen Microbiol* 138:1211-1219.

- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M y Grepinet O (1995) Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 Kda and 36 Kda outer membrane proteins of *Brucella*. Microbiology-Uk 141:2111-2121.
- Cloeckaert A, Debbarh HS, Vizcaíno N *et al.* (1996a) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. FEMS Microbiol Lett 140:139-144.
- Cloeckaert A, Debbarh HS, Zygmunt MS y Dubray G (1996b) Production and characterisation of monoclonal antibodies to *Brucella melitensis* cytosoluble proteins that are able to differentiate antibody responses of infected sheep from Rev. 1 vaccinated sheep. J Med Microbiol 45:206-213.
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M y Grepinet O (1996c) Polymorphism at the *dnaK* locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species-specific marker. J Med Microbiol 45:200-205.
- Cloeckaert A, Baucheron S, Vizcaíno N y Zygmunt MS (2001a) Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Clin Diagn Lab Immunol 8:772-775.
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M *et al.* (2001b) Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. Microbes Infect 3:729-738.
- Cloeckaert A, Grayon M y Grepinet O (2002a) Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. Vaccine 20:2546-2550.
- Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet JY, Bowden RA y Elzer PH (2002b) Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. Vet Microbiol 90:229-247.
- Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O y Boumedine KS (2003) Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. Microbes Infect 5:593-602.
- Cloeckaert A, Jacques I, Grillo MJ *et al.* (2004) Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. Vaccine 22:2827-2835.
- Colmenero JD, Clavijo E, Morata P, Bravo MJ y Queipo-Ortuno MI (2011) Quantitative real-time polymerase chain reaction improves conventional microbiological diagnosis in an outbreak of brucellosis due to ingestion of unpasteurized goat cheese. Diagn Microbiol Infect Dis 71:294-296.

- Commander NJ, Spencer SA, Wren BW y MacMillan AP (2007) The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine* 25:43-54.
- Cooper CW (1992) Risk factors in transmission of brucellosis from animals to humans in Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86:206-209.
- Corbel MJ (1985a) Comparison of *Brucella abortus* and *B. melitensis* antigens for the Rose Bengal plate test on sera from cattle infected with *B. abortus* biovar-5. *Vet Rec* 117:385-386.
- Corbel MJ (1985b) Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Veterinary Bulletin* 55:927.
- Corbel MJ (1988) International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 38:450-452.
- Corbel MJ (1991) Identification of dye-sensitive strains of *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol* 29:1066-1068.
- Corbel MJ (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3:213-221.
- Cortez A, Scarcelli E, Soares RM *et al.* (2001) Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. *Aust Vet J* 79:500-501.
- Cosivi O y Corbel MJ (1998) WHO consultation on the development of new/improved brucellosis vaccines. 17 December 1997, Geneva, Switzerland. *Biologicals* 26:361-363.
- Cotton CM (1953) An intensive study of postvaccination responses in groups of calves vaccinated intracutaneously and subcutaneously with strain 19 *Brucella abortus* vaccine. *Am J Vet Res* 14:337-342.
- Crespo F (1994) Influencia de los elementos y factores geográficos en la epidemiología de la brucelosis del ganado ovino y caprino. *Papeles de la Geografía*:189-209.
- Crespo F. (1994) Brucelosis ovina y caprina. Paris, France.
- Crespo LF, Saez Llorente JL, Reviriego Gordejo FJ, Rodríguez Ferri EF y Durán Ferrer M (2012) Complementary tools for the control and eradication of caprine and ovine brucellosis in the European Union. *Rev Sci Tech* 31:985-996.
- Crowther RW, Orphanides A y Polydorou K (1977) Vaccination of adult sheep with reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev.1: Safety and serological responses. *Trop Anim Health Prod* 9:85-91.



- D'Anastasio R, Staniscia T, Milia ML, Manzoli L y Capasso L (2011) Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiol Infect* 139:149-156.
- Da Costa M., Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiebaud M y Dubray G (1996) Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J Appl Bacteriol* 81:267-275.
- Dauphin LA, Hutchins RJ, Bost LA y Bowen MD (2009) Evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for recovery of *Brucella* DNA from suspensions and spiked swabs. *J Clin Microbiol* 47:3920-3926.
- De BK, Stauffer L, Koylass MS *et al.* (2008) Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol* 46:43-49.
- de Massis F, Giovannini A, Di EB *et al.* (2005) Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Vet Ital* 41:291-299.
- De Santis R, Ciammaruconi A, Faggioni G *et al.* (2009) Lab on a chip genotyping for *Brucella* spp. based on 15-loci multi locus VNTR analysis. *BMC Microbiol* 9:66.
- Debbarh HS, Cloeckaert A, Zygmunt MS y Dubray G (1995) Identification of sero-reactive *Brucella melitensis* cytosoluble proteins which discriminate between antibodies elicited by infection and Rev.1 vaccination in sheep. *Vet Microbiol* 44:37-48.
- Debbarh HS, Zygmunt MS, Dubray G y Cloeckaert A (1996) Competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* BP26 protein to evaluate antibody responses in infected and *B. melitensis* Rev.1 vaccinated sheep. *Vet Microbiol* 53:325-337.
- Debenedictis C, Joubbeh S, Zhang G, Barria M y Ghohestani RF (2001) Immune functions of the skin. *Clin Dermatol* 19:573-585.
- Delgado S, Cármenes P y Fernández M (1995a) Seroprevalence and lack of abortions after vaccination of Churra sheep with reduced doses of Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine by subcutaneous or conjunctival routes. *Prev Vet Med* 23:153-161.
- Delgado S, Fernández M y Cármenes P (1996) Influence of age and stage of gestation on serological response to subcutaneous or conjunctival *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccination in ewes. *Small Ruminant Research* 19:63-68.
- Delgado S, Fernández M y Carmenes P (1995b) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of sheep infected and vaccinated with *Brucella melitensis*. *J Vet Diagn Invest* 7:206-209.



- Delpino MV, Cassataro J, Fossati CA y Baldi PC (2003) Antibodies to the CP24 protein of *Brucella melitensis* lack diagnostic usefulness in ovine brucellosis. Vet Microbiol 93:101-107.
- DelVecchio VG, Kapatral V, Elzer P, Patra G y Mujer CV (2002a) The genome of *Brucella melitensis*. Vet Microbiol 90:587-592.
- DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ *et al.* (2002b) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc Natl Acad Sci U S A 99:443-448.
- Demirdal T y Demirturk N (2008) Laboratory-acquired brucellosis. Ann Acad Med Singapore 37:86-87.
- Denoel PA, Vo TK, Tibor A *et al.* (1997) Characterization, occurrence, and molecular cloning of a 39-kilodalton *Brucella abortus* cytoplasmic protein immunodominant in cattle. Infect Immun 65:495-502.
- Detilleux PG, Deyoe BL y Cheville NF (1990) Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy. Vet Pathol 27:317-328.
- Díaz R, Garatea P, Jones LM y Moriyón I (1979) Radial immunodiffusion test with A *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. Journal of Clinical Microbiology 10:37-41.
- Díaz R, Jones LM y Wilson JB (1968) Antigenic relationship of the gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough brucellae. J Bacteriol 95:618-624.
- Díaz R, Toyos J, Salvo MD *et al.* (1984) Studies on the polysaccharide B and native haptene of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype 9. Dev Biol Stand 56:213-220.
- Díaz-Aparicio E, Aragón V, Marín C *et al.* (1993) Comparative analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. J Clin Microbiol 31:3136-3141.
- Díaz-Aparicio E, Marín C, Alonso-Urmeneta B *et al.* (1994) Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. J Clin Microbiol 32:1159-1165.
- Díaz-Aparicio E, Moriyón I, Blasco JM, Marín C y Díaz R (1996) Diagnóstico de *Brucella melitensis* en ovinos usando inmunodifusión radial con hapteno nativo. Tec Pecu Mex 34:99-103.

- Díaz-Aparicio E y Díaz (2013) Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. Rev Sci Tech 32:53-60.
- Ding J, Pan Y, Jiang H *et al.* (2011) Whole genome sequences of four *Brucella* strains. J Bacteriol 193:3674-3675.
- DIRECCION GENERAL DE RECURSOS Agricolas y Ganaderos, Subdireccion General de Sanidad de la Producción Primaria and Ministerio de Agricultura AyMA. Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis Ovina y Caprina 2012. 2012.
- Doménech-Martínez M, Garrifo P y Mora MT (2009) Brucellosis a final del siglo XX, ¿es necesario desarrollar una vacuna humana? An Vet (Murcia) 25:71-85.
- Douglas JT y Palmer DA (1988) Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. J Clin Microbiol 26:1353-1356.
- Dubray G y Plommet M (1976) Structure and constituents of *Brucella*. Characterization and biological properties of the fractions. Dev Biol Stand 31:68-91.
- Durán-Ferrer M, León L, Nielsen K *et al.* (2004) Antibody response and antigen-specific gamma-interferon profiles of vaccinated and unvaccinated pregnant sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. Vet Microbiol 100:219-231.
- Durán-Ferrer M y Paramio J (2005) Brucellosis ¿una lucha infinita? Tierras 118:19-28.
- Ebadi A y Zowghi E (1983) The use of allergic test in the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Br Vet J 139:456-461.
- Ebrahimi M, Nejad RB, Alamian S *et al.* (2012) Safety and efficacy of reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev. 1 vaccine in pregnant Iranian fat-tailed ewes. Vet Ital 48:405-412.
- Edmonds MD, Cloeckaert A, Hagius SD *et al.* (2002) Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Deltaomp25 deletion mutant. Res Vet Sci 72:235-239.
- Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U *et al.* (2012) Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. Appl Environ Microbiol 78:3753-3755.
- el Idrissi AH, Benkirane A, el MM *et al.* (2001) Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. Rev Sci Tech 20:741-747.

- el-Tras WF, Tayel AA, Eltholth MM and Guitian J (2010) *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. Vet Microbiol 141:321-325.
- Elberg SS, Henderson DW, Herzberg M y Peacock S (1955a) Immunization against *Brucella* infection. IV. Response of monkeys to injection of a streptomycin-dependent strain of *Brucella melitensis*. J Bacteriol 69:643-648.
- Elberg SS, Steiner PE y Doll JP (1955b) Immunization against *Brucella* infection. V. Histopathologic appraisal of immunity induced in mice by a streptomycin-dependent mutant of *Brucella melitensis*. Am J Pathol 31:1065-1075.
- Elberg SS y Faunce K, Jr. (1957) Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. J Bacteriol 73:211-217.
- Elberg SS y Meyer KF (1958) Caprine immunization against brucellosis; a summary of experiments on the isolation, properties and behaviour of a vaccine strain. Bull World Health Organ 19:711-724.
- Elberg SS (1959) Immunization against *Brucella* infection. 7. Immunological and epidemiological studies in Cordoba, Spain. Bull World Health Organ 20:1033-1052.
- Elberg SS y Faunce WK, Jr. (1962) Immunization against *Brucella* infection. 8. The response of *Cynomolgus philippinensis*, guinea-pigs and pregnant goats to injection by the Rev 1 strain of *Brucella melitensis*. Bull World Health Organ 26:421-436.
- Elberg SS (1981) Rev1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II 1968-1980. The Veterinary Bulletin 51:67-73.
- Elberg SS (1996) Rev1 *Brucella melitensis* vaccine. Part III 1981-1995. Veterinary Bulletin 66:1193-1200.
- Elzer PH, Enright FM, McQuiston JR, Boyle SM y Schurig GG (1998) Evaluation of a rough mutant of *Brucella melitensis* in pregnant goats. Res Vet Sci 64:259-260.
- Elzer PH, Hagius SD, Davis DS, DelVecchio VG y Enright FM (2002) Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. Vet Microbiol 90:425-431.
- Enright E (1990) The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In: Nielsen & Duncan (ed), Animal Brucellosis pp. 301-320. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

- Entessar F, Ardalan A, Ebadi A y Jones LM (1967) Effect of living Rev. 1 vaccine in producing long-term immunity against *Brucella melitensis* infection in sheep in Iran. J Comp Pathol 77:367-376.
- Erasmus JA y Bergh EC (1985) Ovine brucellosis: repeated vaccination with Rev 1 vaccine and the prevalence of the disease in the Winburg district. J S Afr Vet Assoc 56:205-208.
- Erdem R, Williams CF y Stableforth AW (1970) *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine experiments on the duration of immunity. Second pregnancy challenge. Pendik Veteriner Kontrol ve Arastirma Enstituesue dergisi 2:-20.
- Esteban-Velázquez E (1982) Brucelosis en la cabra y en la oveja. pp. 199-204.
- Etxeberria F (1994) Vertebral epiphysitis: early signs of brucellar disease. Journal of Paleopathology 6:41-49.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2013) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2011. EFSA journal 11:3129.
- European Union (1999). White paper on food safety. COM. Comission of the European Communities.
- Evans A (1918) Further studies on *Bacterium abortus* and related bacteria. A comparison of *Bacterium abortus* with *Bacterium bronchisepticus* and with the organism which causes Malta Fever. J Infect Dis 22:580-593.
- Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, Cummins DR y Miller WG (1994) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). J Vet Diagn Invest 6:448-452.
- Ewalt DR, Payeur JB, Rhyhan JC y Geer PL (1997) *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. J Vet Diagn Invest 9:417-420.
- Eze MO, Yuan L, Crawford RM *et al.* (2000) Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. Infect Immun 68:257-263.
- Falade S (1978) A comparison of three serological tests in the diagnosis of caprine brucellosis. Res Vet Sci 24:376-377.
- Falade S (1983) Serological response of sheep to *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. Zentralbl Veterinarmed B 30:546-551.

- FAO. *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East. FAO Animal Production and Health Proceedings 10. 2009.
- Farina R (1985) Current serological methods in *B. melitensis*. In: Plommet MVJM (ed), *Brucella melitensis* pp. 139-146.
- Farrell ID (1974) The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. Res Vet Sci 16:280-286.
- Fekete A, Bantle JA, Halling SM y Sanborn MR (1990) Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol 69:216-227.
- Fekete A, Bantle JA, Halling SM y Stich RW (1992) Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. J Bacteriol 174:7778-7783.
- Fensterbank R y Plommet M (1979) Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. IV. Comparison between two methods of vaccination. Ann Rech Vet 10:131-139.
- Fensterbank R, Pardon P y Marly J (1982a) Comparison between subcutaneous and conjunctival route of vaccination with Rev. 1 strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. Ann Rech Vet 13:295-301.
- Fensterbank R, Pardon P y Marly J (1982b) Efficacy of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine against *Brucella ovis* infection in rams. Ann Rech Vet 13:185-190.
- Fensterbank R (1985) Allergic diagnosis of brucellosis. In: Nijhoff (ed), *Brucella melitensis* pp. 167-172. Dordrecht.
- Fensterbank R, Pardon P y Marly J (1985) Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. Ann Rech Vet 16:351-356.
- Fensterbank R (1987) Brucellosis in cattle, sheep and goats: diagnosis, control and vaccination. In: Office International des Epizooties P (ed), Technical Series pp. 9-35.
- Fensterbank R, Verger JM y Grayon M (1987) Conjunctival vaccination of young goats with *Brucella melitensis* strain Rev 1. Ann Rech Vet 18:397-403.
- Fernández-Lago L, Moriyon I, Toyos J y Diaz R (1982) Immunological identity of *Brucella* native hapten, polysaccharide B, and *Yersinia enterocolitica* serotype 9 native hapten. Infect Immun 38:778-780.

- Fernández-Lago L, Monte M y Chordi A (1996) Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in *Brucella abortus* 2308 infection in mice. FEMS Immunol Med Microbiol 15:109-114.
- Ferreira AC, Cardoso R, Travassos D, I *et al.* (2003) Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Vet Res 34:297-305.
- Ferrer LM y Gil J (1994) Aislamiento de la cepa vacunal *B. melitensis* Rev. 1 en un brote abortivo de la comarca de Pinares.
- Ferroglio E, Tolari F, Bollo E y Bassano B (1998) Isolation of *Brucella melitensis* from alpine ibex. J Wildl Dis 34:400-402.
- Ficht T (2010) *Brucella* taxonomy and evolution. Future Microbiol 5:859-866.
- Ficht TA (2002) Discovery of *Brucella* virulence mechanisms using mutational analysis. Vet Microbiol 90:311-315.
- Ficht TA y Adams LG (2009) Brucellosis. In: Alan D.T.Barrett y Lawrence R.Stanberry (ed), Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases pp. 807-829.
- Flores M (1978) Disposiciones legales sobre brucelosis y estudio comparativo de las bases legales vigentes en España y en otros países. Recientes aportaciones veterinarias sobre brucelosis pp. 221-229.
- Fosgate GT, Carpenter TE, Chomel BB *et al.* (2002) Time-space clustering of human brucellosis, California, 1973-1992. Emerg Infect Dis 8:672-678.
- Foster G, MacMillan AP, Godfroid J *et al.* (2002) A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. Vet Microbiol 90:563-580.
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I y Cloeckeaert A (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol 57:2688-2693.
- Foster JT, Okinaka RT, Svensson R *et al.* (2008) Real-time PCR assays of single-nucleotide polymorphisms defining the major *Brucella* clades. J Clin Microbiol 46:296-301.
- Franco MP, Mulder M, Gilman RH y Smits HL (2007) Human brucellosis. Lancet Infect Dis 7:775-786.
- Fretin D, Fauconnier A, Kohler S *et al.* (2005) The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. Cellular Microbiology 7:687-698.

- Funk ND, Tabatabai LB, Elzer PH *et al.* (2005) Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Brucella melitensis*-specific antibodies in goat milk. J Clin Microbiol 43:721-725.
- Galindo RC, Munoz PM, de Miguel MJ *et al.* (2009) Characterization of possible correlates of protective response against *Brucella ovis* infection in rams immunized with the *B. melitensis* Rev 1 vaccine. Vaccine 27:3039-3044.
- Gamazo C, Winter AJ, Moriyón I *et al.* (1989) Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. Infect Immun 57:1419-1426.
- García-Bocanegra I, Allepuz A, Pérez JJ *et al.* (2014) Evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of brucellosis due to *Brucella melitensis* in sheep. Vet J 199:439-445.
- García-Carrillo C (1980) Comparison of *B. melitensis* Rev. 1 and *B. abortus* strain 19 as a vaccine against brucellosis in cattle. Zentralbl Veterinarmed B 27:131-138.
- García-Carrillo C (1981) Protection of rams against *Brucella ovis* infection by *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. Zentralbl Veterinarmed B 28:425-431.
- García-Carrillo C (1986) Comparison of immunity produced by *B. melitensis* Rev. 1 and *B. abortus* strain 19 in guinea pigs challenged a month and a year after vaccination. Zentralbl Veterinarmed B 33:231-236.
- García-Yoldi D, Le FP, Marín CM *et al.* (2007) Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. Vaccine 25:2858-2862.
- García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ *et al.* (2006) Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. Clin Chem 52:779-781.
- Gargani G y López-Merino A (2006) International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the taxonomy of *Brucella* correspondence report (interim report 1991-1993). Int J Syst Evol Microbiol 56:1167-1168.
- Garin-Bastuji B, Oudar J, Richard Y y Gastellu J (1990) Isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from a chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the southern French Alps. J Wildl Dis 26:116-118.
- Garin-Bastuji B, Blasco JM, Grayon M y Verger JM (1998) *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. Vet Res 29:255-274.



- Garin-Bastuji B, Blasco JM, Marín C y Albert D (2006) The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Ruminant Research* 62:63-70.
- Garofolo G, Ancora M y Di GE (2013) MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods* 92:103-107.
- Gaumont R, Trap D y Dhennin L (1984) Immunization of ewes and she-goats against experimental *Brucella melitensis* infection. A comparison of REV 1 and H 38 vaccines. *Dev Biol Stand* 56:629-642.
- Gill P y Ghaemi A (2008) Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27:224-243.
- Godfroid F, Taminiau B, Danese I *et al.* (1998) Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* 66:5485-5493.
- Godfroid J (2002) Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech* 21:277-286.
- Godfroid J y Kasbohrer A (2002) Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet Microbiol* 90:135-145.
- Godfroid J, Cloeckert A, Liautard JP *et al.* (2005) From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* 36:313-326.
- Godfroid J, Nielsen K y Saegerman C (2010) Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J* 51:296-305.
- Godfroid J, Scholz HC, Barbier T *et al.* (2011) Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med* 102:118-131.
- Godfroid J, Al DS, Pappas G *et al.* (2013a) A "One Health" surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36:241-248.
- Godfroid J, Garin-Bastuji B, Saegerman C y Blasco JM (2013b) Brucellosis in terrestrial wildlife. *Rev Sci Tech* 32:27-42.
- Goel D y Bhatnagar R (2012) Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Mol Immunol* 51:159-168.
- González D, Grillo MJ, de Miguel MJ *et al.* (2008) Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS ONE* 3:e2760.



- Gopaul KK, Koylass MS, Smith CJ y Whatmore AM (2008) Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. BMC Microbiol 8:86.
- Gortázar C, Ferroglio E, Hofle U, Frohlich B. y Vicente J (2007) Diseases shared between wildlife and livestock: an European perspective. European Journal of Wildlife Research 53:241-256.
- Gorvel JP y Moreno E (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet Microbiol 90:281-297.
- Gorvel JP (2008) *Brucella*: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. Microbes Infect 10:1010-1013.
- Gradwell DV y Van Zyl FE (1975) Effectivity of Rev 1 vaccine in rams against *Brucella ovis* infection. J S Afr Vet Assoc 46:349-351.
- Grillo MJ, Barberán M y Blasco JM (1997) Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. Vet Rec 140:602-605.
- Grillo MJ, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyón I y Moreno E (2012) What have we learned from brucellosis in the mouse model? Vet Res 43:29.
- Groussaud P, Shankster SJ, Koylass MS y Whatmore AM (2007) Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. J Med Microbiol 56:1512-1518.
- Gruner E, Bernasconi E, Galeazzi RL *et al.* (1994) Brucellosis: an occupational hazard for medical laboratory personnel. Report of five cases. Infection 22:33-36.
- Guo F, Zhang H, Chen C *et al.* (2012) Autophagy favors *Brucella melitensis* survival in infected macrophages. Cell Molec Biol Lett 17:249-257.
- Gupta VK, Rout PK y Vihan VS (2007) Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M. Res Vet Sci 82:305-313.
- Gupta VK, Radhakrishnan G, Harms J y Splitter G (2012) Invasive *Escherichia coli* vaccines expressing *Brucella melitensis* outer membrane proteins 31 or 16 or periplasmic protein BP26 confer protection in mice challenged with *B. melitensis*. Vaccine 30:4017-4022.
- Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, von Eichel-Streiber C *et al.* (2001) GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. J Biol Chem 276:44435-44443.

- Gwida M, Al DS, Melzer F *et al.* (2010) Brucellosis - regionally emerging zoonotic disease? Croat Med J 51:289-295.
- Hadjichristodoulou C, Voulgaris P, Toulieres L *et al.* (1994) Tolerance of the human brucellosis vaccine and the intradermal reaction test for brucellosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13:129-134.
- Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ *et al.* (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol 187:2715-2726.
- Hamdy ME y Amin AS (2002) Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J 163:299-305.
- Hamdy ME, El-Gibaly SM y Montasser AM (2002) Comparison between immune responses and resistance induced in BALB/c mice vaccinated with RB51 and Rev. 1 vaccines and challenged with *Brucella melitensis* bv. 3. Vet Microbiol 88:85-94.
- Hegazy YM, Molina-Flores B, Shafik H, Ridler AL y Guitian FJ (2011) Ruminant brucellosis in Upper Egypt (2005-2008). Prev Vet Med 101:173-181.
- Herman L y De RH (1992) Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 58:2099-2101.
- Herrera E, Rivera A, Palomares EG, Hernandez-Castro R y Diaz-Aparicio E (2011) Isolation of *Brucella melitensis* from a RB51-vaccinated seronegative goat. Trop Anim Health Prod 43:1069-1070.
- Herzberg M y Elberg SS (1953) Immunization against *Brucella* infection. I. Isolation and Characterization of a streptomycin-dependent mutant. J Bacteriol 66:585-599.
- Herzberg M, Elberg SS y Meyer KF (1953) Immunization against *Brucella* infection. II. Effectiveness of a streptomycin-dependent strain of *Brucella melitensis*. J Bacteriol 66:600-605.
- Herzberg M y Elberg SS (1955) Immunization against *Brucella* infection. III. Response of mice and guinea pigs to injection of viable and nonviable suspensions of a streptomycin-dependent mutant of *Brucella melitensis*. J Bacteriol 69:432-435.
- Higgins J, Stuber T, Quance C *et al.* (2012) Molecular epidemiology of *Brucella abortus* isolates from cattle, elk, and bison in the United States, 1998 to 2011. Appl Environ Microbiol 78:3674-3684.
- Hill W (1963) Standardization of the complement fixation test for brucellosis. Bull Off Int Epiz 60:401-410.

- Hinic V, Brodard I, Thomann A *et al.* (2008) Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *Journal of Microbiological Methods* 75:375-378.
- Hinic V, Brodard I, Thomann A *et al.* (2009) IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Vet Res* 5:22.
- Hinic V, Brodard I, Petridou E *et al.* (2010) Brucellosis in a dog caused by *Brucella melitensis* Rev 1. *Vet Microbiol* 141:391-392.
- Holt HR, Eltholth MM, Hegazy YM *et al.* (2011) *Brucella* spp. infection in large ruminants in an endemic area of Egypt: cross-sectional study investigating seroprevalence, risk factors and livestock owner's knowledge, attitudes and practices (KAPs). *BMC Public Health* 11:341.
- Horwell FD y van Drimmelen GG (1971) *Brucella melitensis* strain Rev I as a vaccine for cattle. *J S Afr Vet Med Assoc* 42:233-235.
- Hoyer BH y McCullough NB (1968) Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. *J Bacteriol* 95:444-448.
- Hubalek Z, Scholz HC, Sedlacek I *et al.* (2007) Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 7:679-687.
- Huber B, Scholz HC, Lucero N y Busse HJ (2009) Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species. *International Journal of Medical Microbiology* 299:563-573.
- Huda A, Lind P, Christoffersen AB y Jungersen G (2003) Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 94:95-103.
- Huddleson IF (1931) Differentiation of the Species of the Genus *Brucella*. *American Journal of Public Health and the Nations Health* 21:491-498.
- Hunter D y Allen J (1972) An evaluation of milk and blood tests used to diagnose brucellosis. *Vet Rec* 91:310-312.
- Ilhan Z, Solmaz H, Aksakal A *et al.* (2007) Comparison of PCR assay and bacteriological culture method for the detection of *Brucella melitensis* in stomach content samples of aborted sheep fetuses. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 114:460-464.

- Ilhan Z, Aksakal A, Ekin IH *et al.* (2008) Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Lett Appl Microbiol* 46:301-306.
- Jacques I, Olivier-Bernardin V y Dubray G (1998) Efficacy of ELISA compared to conventional tests (RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet Microbiol* 64:61-73.
- Jacques I, Verger JM, Laroucau K *et al.* (2007) Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by bp26 and omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants in sheep. *Vaccine* 25:794-805.
- Jahans KL, Foster G y Broughton ES (1997) The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* 57:373-382.
- Jain-Gupta N, Contreras-Rodríguez A, Vemulapalli R *et al.* (2012) Pluronic P85 enhances the efficacy of outer membrane vesicles as a subunit vaccine against *Brucella melitensis* challenge in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*.
- Jiang H, Fan M, Chen J *et al.* (2011) MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates. *BMC Microbiol* 11:256.
- Jiang X y Baldwin CL (1993) Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 61:124-134.
- Jiang X, Leonard B, Benson R y Baldwin CL (1993) Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* 151:309-319.
- Jiménez de Bagues MP, Marín CM, Barberán M y Blasco JM (1989) Responses of ewes to *B. melitensis* Rev1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann Rech Vet* 20:205-213.
- Jiménez de Bagues MP, Marín CM, Blasco JM, Moriyón I y Gamazo C (1992) An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* strain Rev 1 vaccination. *Vet Microbiol* 30:233-241.
- Jiménez de Bagues MP, Elzer PH, Jones SM *et al.* (1994) Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infect Immun* 62:4990-4996.
- Jiménez de Bagues MP, Barberán M, Marín CM y Blasco JM (1995) The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* 13:301-304.

- Jiménez de Bagues MP, Terraza A, Gross A y Dornand J (2004) Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect Immun* 72:2429-2433.
- Jones LM, Thomson PD y Alton GG (1958) Production of immunity against experimental *Br. melitensis* infection in goats; a comparison of two killed and one living vaccine. *J Comp Pathol* 68:274-287.
- Jones LM, Entessar F y Ardalan A (1964) Comparison of living vaccines in producing immunity against natural *Brucella melitensis* infection in sheep and goats in Iran. *J Comp Pathol* 74:17-30.
- Jones LM, García-Carrillo C y Alton GG (1973b) *Brucella melitensis* Rev. 1 and *Brucella abortus* 45-20 vaccines in goats: serologic tests. *Am J Vet Res* 34:199-202.
- Jones LM, Díaz R y Taylor AG (1973a) Characterization of allergens prepared from smooth and rough strains of *Brucella melitensis*. *Br J Exp Pathol* 54:492-508.
- Jones LM (1974) Specificity of *Brucella* protein antigens and role of lipopolysaccharide antigens in eliciting delayed hypersensitivity reactions in sensitized guinea pigs. *Ann Rech Vet* 5:189-199.
- Jones LM y Marly J (1975a) Serological and bacteriological studies of ewes vaccinated with *Brucella melitensis* strain Rev. 1 during lactation. *Ann Rech Vet* 6:67-71.
- Jones LM y Marly J (1975b) Titration of a *Brucella* protein allergen in sheep sensitized with *Brucella melitensis*. *Ann Rech Vet* 6:173-178.
- Jones LM, Berman DT, Moreno E *et al.* (1980) Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J Clin Microbiol* 12:753-760.
- Kahler SC (2000) *Brucella melitensis* infection discovered in cattle for first time, goats also infected. *JAVMA* 216:648.
- Kalinowski ST, Taper ML y Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099-1106.
- Kaneene JM, Anderson RK, Muscoplat CC y Johnson DW (1979) Cell-mediated immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 vaccine and nonexposed control animals of the same age. *Am J Vet Res* 40:999-1004.

- Kang SI, Her M, Heo EJ *et al.* (2009) Molecular typing for epidemiological evaluation of *Brucella abortus* and *Brucella canis* isolated in Korea. *Journal of Microbiological Methods* 78:144-149.
- Kasymbekov J, Imanseitov J, Ballif M *et al.* (2013) Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of livestock *Brucella melitensis* isolates from Naryn Oblast, Kyrgyzstan. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2047.
- Kato Y, Masuda G, Itoda I *et al.* (2007) Brucellosis in a returned traveler and his wife: probable person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *J Travel Med* 14:343-345.
- Kattar MM, Jaafar RF, Araj GF *et al.* (2008) Evaluation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella* isolates in a region of brucellosis endemicity. *J Clin Microbiol* 46:3935-3940.
- Kaufmann AF, Meltzer MI y Schmid GP (1997) The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? *Emerg Infect Dis* 3:83-94.
- Ke Y, Zhen Q, Li T *et al.* (2012) Complete genome sequence of *Brucella melitensis* 133, an isolate of biovar 1 of sequence type 32. *J Bacteriol* 194:6932.
- Keleti G, Feingold DS y Youngner JS (1974) Interferon induction in mice by lipopolysaccharide from *Brucella abortus*. *Infect Immun* 10:282-283.
- Keppies J, Williams A, Witt K y Smith H (1965) The role of erythritol in the tissue localization of Brucellae. *British Journal of Experimental Pathology* 46:104-108.
- Kim S, Lee DS, Watanabe K *et al.* (2005) Interferon-gamma promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiol* 5:22.
- Kim YC, Jarrahan C, Zehrung D, Mitragotri S y Prausnitz MR (2012) Delivery systems for intradermal vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* 351:77-112.
- Kirandziski T, Nikolovska G, Nakova E *et al.* (2010) Brucellosis control in small ruminants in the Republic of Macedonia. *Prilozi*:181-190.
- Kittelberger R, Reichel MP, Joyce MA y Staak C (1997) Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9. III. Specificity of the in vitro antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis diagnosis in experimentally *Yersinia enterocolitica* 0:9-infected cattle. *Vet Microbiol* 57:361-371.
- Kolar J (1984) Diagnosis and control of brucellosis in small ruminants. *Prev Vet Med* 2:215-225.

- Kolar J (1995) Some experience from brucellosis control with Rev. 1 vaccine in a heavily infected country- Mongolia. FAO/WHO/OIE Round Table on the Use of Rev. 1 Vaccine in Small Ruminants and Cattle, 77-81. CNEVA, Alfort, France.
- Kousoulis AA, Economopoulos KP, Poulakou-Rebelakou E, Androutsos G y Tsiodras S (2012) The plague of Thebes, a historical epidemic in Sophocles' Oedipus Rex. *Emerg Infect Dis* 18:153-157.
- Kulakov I, Gorelov VN, Motin VL, Brukhanskii GV y Skavronskaia AG (1992) A highly sensitive non-isotopic system of DNA hybridization using amplification (PCR) for identifying and indicating presence of *Brucella*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*:23-27.
- Lambert PH y Laurent PE (2008) Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine* 26:3197-3208.
- Lantier F y Fensterbank R (1985) Kinetics of Rev 1 infection in sheep. pp. 247-251.
- Lapaque N, Moriyón I, Moreno E y Gorvel JP (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology* 8:60-66.
- Le Fleche P, Jacques I, Grayon M *et al.* (2006) Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 6:9.
- Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A y Martínez-Soriano JP (1995) Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 33:3087-3090.
- Lebuhn M, Bathe S, Achouak W *et al.* (2006) Comparative sequence analysis of the internal transcribed spacer 1 of *Ochrobactrum* species. *Syst Appl Microbiol* 29:265-275.
- Leyla G, Kadri G y Umran O (2003) Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet Microbiol* 93:53-61.
- Li T, Yuan X, Ding J *et al.* (2012) Genome sequence of *Brucella melitensis* strain 128, an isolate of biovar 3 of sequence type 8. *J Bacteriol* 194:6960.
- Lilenbaum W, de Souza GN, Ristow P *et al.* (2007) A serological study on *Brucella abortus*, caprine arthritis-encephalitis virus and Leptospira in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet J* 173:408-412.
- Lim AA (1988) Efficacy of conjunctival immunization of cattle against brucellosis. *Soviet agricultural sciences* 3:69-71.



- Limet J, Plommet AM, Dubray G y Plommet M (1987) Immunity conferred upon mice by anti-LPS monoclonal antibodies in murine brucellosis. *Ann Inst Pasteur Immunol* 138:417-424.
- Lin GZ, Zheng FY, Zhou JZ *et al.* (2011) Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *omp25* gene for rapid detection of *Brucella* spp. *Molecular and Cellular Probes* 25:126-129.
- López-Goni I, Guzmán-Verri C, Manterola L *et al.* (2002) Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol* 90:329-339.
- López-Goni I, García-Yoldi D, Marín CM *et al.* (2008) Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol* 46:3484-3487.
- López-Merino A, Asselineau J, Serre A *et al.* (1976) Immunization by an insoluble fraction extracted from *Brucella melitensis*: immunological and chemical characterization of the active substances. *Infect Immun* 13:311-321.
- López-Olvera J, Vidal D, Vicente J *et al.* (2009) Serological survey of selected infectious diseases in mouflon (*Ovis aries musimon*) from south-central Spain. *European Journal of Wildlife Research* 55:75-79.
- Lord VR, Cherwonogrodzky JW, Schurig GG *et al.* (1998) Venezuelan field trials of vaccines against brucellosis in swine. *Am J Vet Res* 59:546-551.
- Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI y Jacob NR (2008) *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect* 136:496-503.
- Mackinnon D (1963) The complement fixation test in brucellosis. *Bull Off Int Epiz* 60:383-400.
- MacMillan AP, Greiserwilke I, Moennig V y Mathias LA (1990) A Competition Enzyme-Immunoassay for Brucellosis Diagnosis. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 97:83-85.
- Magnani DM, Harms JS, Durward MA y Splitter GA (2009) Nondividing but metabolically active gamma-irradiated *Brucella melitensis* is protective against virulent *B. melitensis* challenge in mice. *Infect Immun* 77:5181-5189.
- Magoffin RL y Spink WW (1951) The protection of intracellular *Brucella* against streptomycin alone and in combination with other antibiotics. *J Lab Clin Med* 37:924-930.
- Mahajan NK y Kulshreshtha RC (1991) Comparison of serological tests for *Brucella melitensis* infection in sheep. *Trop Anim Health Prod* 23:11-16.



- Mantur BG, Mangalgi SS y Mulimani M (1996) *Brucella melitensis*--a sexually transmissible agent? Lancet 347:1763.
- Mantur BG, Amarnath SK y Shinde RS (2007) Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. Indian J Med Microbiol 25:188-202.
- Marianelli C, Graziani C, Santangelo C *et al.* (2007) Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. J Clin Microbiol 45:2923-2928.
- Marianelli C, Martucciello A, Tarantino M *et al.* (2008) Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk. J Dairy Sci 91:3779-3786.
- Marín CM, Barberán M, Jiménez de Bagues MP y Blasco JM (1990) Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. Res Vet Sci 48:209-215.
- Marín CM, Jiménez de Bagues MP, Barberán M y Blasco JM (1996) Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. Veterinary Record 138:409-411.
- Marín CM, Moreno E, Moriyón I, Díaz R y Blasco JM (1999) Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol 6:269-272.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LE y Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Mol Ecol 7:639-655.
- Marston J (1863) Report on Fever (Malta). Army Medical Department Medical Report for 1861 3:520-521.
- Martínez de TG, Pizarro-Cerda J, Moreno E y Moriyón I (1995) The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. Infect Immun 63:3054-3061.
- Martínez D, Morales JA, Peniche AE *et al.* (2010) Use of RB51 vaccine for small ruminants brucellosis prevention in Veracruz, Mexico. International Journal of Dairy Sciences 5:10-17.
- Martins H, Garin-Bastuji B, Lima F *et al.* (2009) Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal--Outcome of a 5-year programme (2002-2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination. Prev Vet Med 90:80-89.

- Maudlin I y Weber-Mosdorf S. The control of neglected zoonotic diseases. WHO/SDE/FOS/2006.1. 2006.
- Maves RC, Castillo R, Guillen A *et al.* (2011) Antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* isolates in Peru. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1279-1281.
- Mayer-Scholl A, Draeger A, Gollner C, Scholz HC y Nockler K (2010) Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *Journal of Microbiological Methods* 80:112-114.
- McCamish J y ELBERG SS (1962) Immunization Against *Brucella* Infection: IX. The Response of the Guinea Pig to the Immunizing Strain (Rev. 1) of *Brucella melitensis*. *Am J Pathol* 40:77-93.
- McDermott J, Grace D y Zinsstag J (2013) Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Rev Sci Tech* 32:249-261.
- McGiven JA, Sawyer J, Perrett LL *et al.* (2008) A new homogeneous assay for high throughput serological diagnosis of brucellosis in ruminants. *J Immunol Methods* 337:7-15.
- McGiven JA, Thompson IJ, Commander NJ y Stack JA (2009) Time-resolved fluorescent resonance energy transfer assay for simple and rapid detection of anti-*Brucella* antibodies in ruminant serum samples. *J Clin Microbiol* 47:3098-3107.
- McGiven JA (2013) New developments in the immunodiagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Rev Sci Tech* 32:163-176.
- Memish ZA y Balkhy HH (2004) Brucellosis and international travel. *J Travel Med* 11:49-55.
- Menzies PI (2012) Vaccination programs for reproductive disorders of small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130:162-172.
- Meyer KF y Shawn EB (1920) A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle. Studies on the genus *Brucella* nov. gen. *Journal of Infectious Diseases* 27:173-184.
- Meyer ME y Morgan JB (1973) Designation of Neotype Strains and of Biotype Reference strains for Species of the Genus *Brucella* Meyer and Shaw. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23:135-141.
- Mick V, Le CG, Corde Y *et al.* (2014) *Brucella melitensis* in France: Persistence in Wildlife and Probable Spillover from Alpine Ibex to Domestic Animals. *PLoS ONE* 9:e94168.

- Mikolon AB, Gardner IA, Hernandez De AJ y Hietala SK (1998) Risk factors for brucellosis seropositivity of goat herds in the Mexicali Valley of Baja California, Mexico. *Prev Vet Med* 37:185-195.
- Minas A, Minas M, Stournara A y Tselepidis S (2004) The "effects" of Rev-1 vaccination of sheep and goats on human brucellosis in Greece. *Prev Vet Med* 64:41-47.
- Minas A, Stournara A, Minas M *et al.* (2005) Validation of fluorescence polarization assay (FPA) and comparison with other tests used for diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep. *Vet Microbiol* 111:211-221.
- Minas A, Stournara A, Minas M *et al.* (2007) Validation of a fluorescence polarization assay (FPA) performed in microplates and comparison with other tests used for diagnosing *B. melitensis* infection in sheep and goats. *J Immunol Methods* 320:94-103.
- Minas A, Stournara A, Christodoulopoulos G y Katsoulos PD (2008) Validation of a competitive ELISA for diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet J* 177:411-417.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Programa nacional de erradicación de la brucelosis ovina y caprina (*B. melitensis*) presentado para su cofinanciación 2014.
- Mirnejad R, Doust RH, Kachuei R *et al.* (2012) Simultaneous detection and differentiates of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* by combinatorial PCR. *Asian Pac J Trop Med* 5:24-28.
- Mitragotri S (2005) Immunization without needles. *Nat Rev Immunol* 5:905-916.
- Montaraz JA y Winter AJ (1986) Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun* 53:245-251.
- Montaraz JA, Winter AJ, Hunter DM *et al.* (1986) Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infect Immun* 51:961-963.
- Moreno E, Berman DT y Boettcher LA (1981) Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity* 31:362-370.
- Moreno E, Mayer H y Moriyón I (1987) Characterization of a native polysaccharide hapten from *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity* 55:2850-2853.
- Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M *et al.* (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* 172:3569-3576.

- Moreno E, Cloeckert A y Moriyón I (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. Vet Microbiol 90:209-227.
- Morgan WJ, Littlejohn AI, Mackinnon DJ y Lawson JR (1966) The degree of protection given by living vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in goats. Bull World Health Organ 34:33-40.
- Morgan WJ, Mackinnon DJ, Lawson JR y Cullen GA (1969) The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. Vet Rec 85:636-641.
- Moriyón I, Grillo MJ, Monreal D *et al.* (2004) Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. Vet Res 35:1-38.
- Morse EV, Ristic M, Roberstad GW y Schneider DW (1953) Cross-agglutination reactions among *Brucella*, *Vibrio*, and other microorganisms. Am J Vet Res 14:324-327.
- Mousel MR, Leeds TD, White SN y Herrmann-Hoesing LM (2008) Technical Note: Comparison of traditional needle vaccination with pneumatic, needle-free vaccination for sheep. J Anim Sci 86:1468-1471.
- Mukherjee F, Jain J, Patel V y Nair M (2007) Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. J Med Microbiol 56:1309-1316.
- Muktaderul Ahmed, Md.Ariful Islam, Mst.Minara Khatun y Byeong-Kirl Baek (2011) Evaluation of four Serological Tests for the Detection of Brucellosis in Goats and Cattle under the Field Condition of Bangladesh. Asian Journal of Biological Sciences 4:477-482.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S *et al.* (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1:263-273.
- Munoz PM, de Miguel MJ, Grillo MJ *et al.* (2008) Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. Vaccine 26:2562-2569.
- Munoz PM, Boadella M, Arnal M *et al.* (2010) Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. BMC Infect Dis 10:46.
- Musa MT y Jahans KL (1990) The isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from a testicular hygroma of a ram in a nomadic flock of sheep and goats in western Sudan. J Comp Pathol 103:467-470.

- Navarro E, Escribano J, Fernandez J y Solera J (2002) Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples. FEMS Immunol Med Microbiol 34:147-151.
- Neubauer H (2010) Brucellosis: new demands in a changing world. Prilozi 31:209-217.
- Ne'eman L (1963) A comparative study of the efficacy of three vaccines in conferring resistance on sheep exposed to contact infection with *Brucella melitensis*. Refuah Veterinarith 20:123-134.
- Ne'eman L (1968a) The safety of the Rev1 strain of *Brucella melitensis* for prgnant sheep by natural contact. Refuah Veterinarith 25:265-260.
- Ne'eman L (1968b) Virulence stability of the Rev 1 strain of *Brucella melitensis* on passage in pregnant sheep. Refuah Veterinarith 25:202-188.
- Nicola AM, Elena S, Alonso B y Esteves MJ (2010) Evaluation of the Fluorescence Polarization Assay (FPA) for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats in Argentina. Prilozi 31:133-143.
- Nicolas JF y Guy B (2008) Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. Expert Rev Vaccines 7:1201-1214.
- Nicoletti P (1969) Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. Am J Vet Res 30:1811-1816.
- Nicoletti P (1976) A preliminary report on the efficacy of adult cattle vaccination using Strain 19 in selected dairy herds in Florida. Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc:91-106.
- Nicoletti P (1984) Vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain 19 administered by differing routes and doses. Vaccine 2:133-135.
- Nicoletti P (1990a) Vaccination. In: Nielsen K and Duncan JR (eds), Anial Brucellosis pp. 248-299. CRC Press, Boca Raton.
- Nicoletti P (1990b) Vaccination against *Brucella*. Adv Biotechnol Processes 13:147-168.
- Nicoletti P (2002) A short history of brucellosis. Vet Microbiol 90:5-9.
- Nicoletti P (2010) Brucellosis: past, present and future. Prilozi 31:21-32.
- Nielsen K, Samagh BS y Stemshorn B (1980) Agglutination of *Brucella abortus* cells by sera from cattle experimentally infected with *E. coli*. Vet Microbiol 5:123-134.

- Nielsen K, Heck F, Wagner G *et al.* (1984) Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. *Prev Vet Med* 2:197-204.
- Nielsen K, Gall D, Jolley M *et al.* (1996) A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Journal of Immunological Methods* 195:161-168.
- Nielsen K y Gall D (2001) Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *J Immunoassay Immunochem* 22:183-201.
- Nielsen K (2002) Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol* 90:447-459.
- Nielsen K, Gall D, Smith P *et al.* (2004a) Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Rev Sci Tech* 23:979-987.
- Nielsen K, Smith P, Widdison J *et al.* (2004b) Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet Microbiol* 100:25-30.
- Nielsen K, Gall D, Smith P *et al.* (2005a) Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Small Ruminant Research* 56:253-258.
- Nielsen K, Smith P, Yu W *et al.* (2005b) Towards single screening tests for brucellosis. *Rev Sci Tech* 24:1027-1037.
- Nielsen K, Smith P, Yu W *et al.* (2006) Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* spp. and *Yersinia enterocolitica* O : 9 in cattle and pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109:69-78.
- Nielsen K, Smith P, Yu WL, Elmgren C, Halbert G, Nicoletti P, Perez B, Conde S, Samartino L, Nicola A, Bermudez R, Renteria T. (2008) Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. *Vet Immunol Immunopathol.* 125(3-4):246-50
- Nikolich MP, Warren RL, Lindler LE, Izadjoo MJ y Hoover DL (2010) Attenuation of defined *Brucella melitensis* *wboA* mutants. *Vaccine* 28 Suppl 5:F12-F16.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H *et al.* (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28:E63.
- Noviello S, Gallo R, Kelly M *et al.* (2004) Laboratory-acquired brucellosis. *Emerg Infect Dis* 10:1848-1850.

- O'Leary S, Sheahan M y Sweeney T (2006) *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res Vet Sci* 81:170-176.
- Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y *et al.* (2008) Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol* 104:1815-1823.
- OIE (2009a) Bovine Brucellosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals Chapter 2.4.3.
- OIE (2009b) Caprine and Ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals Chapter 2.7.2.
- OIE. Terrestrial Animal Health Code. Caprine and Ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*). Chapter 14.1. Chapter 14.1., 1-5. 2010.
- Oliveira SC, Soeurt N y Splitter G (2002) Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol* 90:417-424.
- Olle-Goig JE y Canela-Soler J (1987) An outbreak of *Brucella melitensis* infection by airborne transmission among laboratory workers. *Am J Public Health* 77:335-338.
- Olsen SC (2000) Immune responses and efficacy after administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Vet Ther* 1:183-191.
- Olsen SC (2013) Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination. *Rev Sci Tech* 32:207-217.
- Ortner DJ y Frohlich B. (2007) The EB IA tombs and burials of Bab edh-Dhra, Jordan: a bioarchaeological perspective on the people. *International Journal of Osteoarchaeology* 17:358-368.
- Osterman B y Moriyón I (2006) International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1173-1175.
- Ostrowski S, Anajariyya S, Kamp EM y Bedin E (2002) Isolation of *Brucella melitensis* from an arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *Vet Rec* 150:186-188.
- Ouahrani S, Michaux S, Sri WJ *et al.* (1993) Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J Gen Microbiol* 139:3265-3273.



- Ouahrani-Bettache S, Soubrier MP y Liautard JP (1996) IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. J Appl Bacteriol 81:154-160.
- Paixao TA, Roux CM, den Hartigh AB *et al.* (2009) Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. Infect Immun 77:4197-4208.
- Palmer DA y Douglas JT (1989) Analysis of *Brucella* lipopolysaccharide with specific and cross-reacting monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 27:2331-2337.
- Pan W, Wang J-Y, Shen H *et al.* (2011) Development and Application of the Novel Visual Loop-Mediated Isothermal Amplification of *Omp25* Sequence for Rapid detection of *Brucella* sp. Journal of Animal and Veterinary Advances 10:2120-2126.
- Paolicchi FA, Terzolo HR y Campero CM (1993) Isolation of *Brucella suis* from the semen of a ram. Vet Rec 132:67.
- Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M y Tsianos E (2005) Brucellosis. N Engl J Med 352:2325-2336.
- Pappas G, Panagopoulou P, Christou L y Akritidis N (2006a) *Brucella* as a biological weapon. Cell Mol Life Sci 63:2229-2236.
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L y Tsianos EV (2006b) The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis 6:91-99.
- Pappas G y Papadimitriou P (2007) Challenges in *Brucella* bacteraemia. Int J Antimicrob Agents 30 Suppl 1:S29-S31.
- Pappas G (2010) The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. Int J Antimicrob Agents 36 Suppl 1:S8-11.
- Pardon P, Sanchis R, Molenat G *et al.* (1989) Persistence of serologic and allergic reactions in ewes after vaccination with the H.38 or Rev.1 vaccines in a brucellosis (*Brucella melitensis*) enzootic area. Ann Rech Vet 20:65-72.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV y Morita K (2008) Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. Rev Med Virol 18:407-421.
- Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C y Ciuchini F (2001) Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. Infect Immun 69:6541-6544.



- Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE *et al.* (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13148-13153.
- Perkins SD, Smither SJ y Atkins HS (2010) Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiol Rev* 34:379-394.
- Pishva E y Salehi M (2012) First Report of Isolation of *Brucella melitensis*, Vaccine Strain Rev.1 as a Source of Cattle Infection in Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 19:19-23.
- Plommet M y Fensterbank R (1976) Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. III. -- Serological response and immunity in the pregnant cow. *Ann Rech Vet* 7:9-23.
- Plommet M y Plommet AM (1976) Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. *Ann Rech Vet* 7:1-8.
- Plumb GE, Olsen SC y Buttke D (2013) Brucellosis: 'One Health' challenges and opportunities. *Rev Sci Tech* 32:271-278.
- Poester F, Nielsen K, Samartino L y Yu WL (2010) Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal* 4:46-60.
- Poester FP, Samartino LE y Santos RL (2013) Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev Sci Tech* 32:105-115.
- Polydorou K. (1975) Vaccination of sheep with reduced doses of Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. *Bull Off Int Epiz* 4:669-675.
- Portanti O, Tittarelli M, Di FT *et al.* (2006) Development and validation of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of ovine, caprine and bovine brucellosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53:494-498.
- Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL y Graves MH (2004) Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 42:1290-1293.
- Purcell B, Hoover D y Friedlander A (2008) Brucellosis. In: Govt Printing Office (ed), *Medical Aspects of Biological Warfare* pp. 185-198.
- Racloz V, Schelling E, Chitnis N, Roth F y Zinsstag J (2013) Persistence of brucellosis in pastoral systems. *Rev Sci Tech* 32:61-70.
- Radwan AI, Bekairi SI, Al-Mukayel AA y Abu Agla OS (1984) Control of ovine brucellosis in Najdi sheep in Saudi Arabia. *Trop Anim Health Prod* 16:213-218.

- Radwan AI, Bekairi SI y Prasad PV (1992) Serological and bacteriological study of brucellosis in camels in central Saudi Arabia. *Rev Sci Tech* 11:837-844.
- Ragan V, Vroegindewey G y Babcock S (2013) International standards for brucellosis prevention and management. *Rev Sci Tech* 32:189-198.
- Rahman AK, Saegerman C, Berkvens D *et al.* (2013) Bayesian estimation of true prevalence, sensitivity and specificity of indirect ELISA, Rose Bengal Test and Slow Agglutination Test for the diagnosis of brucellosis in sheep and goats in Bangladesh. *Prev Vet Med* 110:242-252.
- Ramírez-Pfeiffer C, Nielsen K, Marin-Ricalde F, Rodríguez-Padilla C y Gómez-Flores R (2006) Comparison of fluorescence polarization assay with card and complement fixation tests for the diagnosis of goat brucellosis in a high-prevalence area. *Vet Immunol Immunopathol* 110:121-127.
- Ramírez-Pfeiffer C, Nielsen K, Smith P *et al.* (2007) Application of the fluorescence polarization assay for detection of caprine antibodies to *Brucella melitensis* in areas of high prevalence and widespread vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 14:299-303.
- Ramírez-Pfeiffer C, Díaz-Aparicio E, Gómez-Flores R *et al.* (2008a) Use of the *Brucella melitensis* native hapten to diagnose brucellosis in goats by a rapid, simple, and specific fluorescence polarization assay. *Clin Vaccine Immunol* 15:911-915.
- Ramírez-Pfeiffer C, Díaz-Aparicio E, Rodríguez-Padilla C *et al.* (2008b) Improved performance of *Brucella melitensis* native hapten over *Brucella abortus* OPS tracer on goat antibody detection by the fluorescence polarization assay. *Vet Immunol Immunopathol* 123:223-229.
- Rantakokko-Jalava K y Jalava J (2002) Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J Clin Microbiol* 40:4211-4217.
- Rashidi JS, Ortner DJ, Frohlich B y Jonsdottir B (2001) Brucellosis in early Bronze Age Jordan and Bahrain: an analysis of possible causes of *Brucella* Spondylitis. *Am J Phys Anthr* 114:122.
- Redkar R, Rose S, Bricker B y DelVecchio V (2001) Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes* 15:43-52.
- Refai M (2002) Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol* 90:81-110.
- Renoux G, Alton GG y Amarasinghe A (1957) Études sur la brucellosis ovine et caprine. XI. Comparison, chez la chèvre auñedoise, de la valeur immunizante

- d'un vaccia tué en excipient irrésorbable et de deux vaccins vivants. Arch, Inst Pasteur, Tunis 34:3-17.
- Reviriego FJ, Moreno MA y Domínguez L (2000) Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. Prev Vet Med 44:167-173.
- Riber U y Jungersen G (2007) Cell-mediated immune responses differentiate infections with *Brucella suis* from *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in pigs. Vet Immunol Immunopathol 116:13-25.
- Rijpens NP, Jannes G, Van AM, Rossau R y Herman LM (1996) Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. Appl Environ Microbiol 62:1683-1688.
- Rittig MG, Kaufmann A, Robins A *et al.* (2003) Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. J Leukoc Biol 74:1045-1055.
- Robichaud S, Libman M, Behr M y Rubin E (2004) Prevention of laboratory-acquired brucellosis. Clin Infect Dis 38:e119-e122.
- Robinson A (2003) Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. FAO Animal Production and Health Paper 156.
- Rodríguez Ferri EF y Crespo F (2000) Brucelosis. Veterinaria en Castilla y León 13:13-43.
- Romero C, Gamazo C, Pardo M y López-Goni I (1995) Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol 33:615-617.
- Romero C y López-Goni I (1999) Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. Appl Environ Microbiol 65:3735-3737.
- Roop RM, Jeffers G, Bagchi T *et al.* (1991) Experimental infection of goat fetuses in utero with a stable, rough mutant of *Brucella abortus*. Res Vet Sci 51:123-127.
- Ross HM, Foster G, Reid RJ, Jahans KL y MacMillan AP (1994) *Brucella* species infection in sea-mammals. Vet Rec 134:359.
- Roop RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC y Martin DW (2009) Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. Med Microbiol Immunol 198:221-238.
- Rossetti OL, Arese AI, Boschioli ML y Cravero SL (1996) Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. J Clin Microbiol 34:165-169.

- Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM y Hughes JM (2002) Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 8:225-230.
- Roth F, Zinsstag J, Orkhon D *et al.* (2003) Human health benefits from livestock vaccination for brucellosis: case study. *Bull World Health Organ* 81:867-876.
- Sales Henriques HLR, Hueston W, Hoblet K y Shulaw W (1992) Field trials evaluating the safety and serologic reactions of reduced-dose *Brucella melitensis* Rev 1 vaccination in adult sheep. *Prev Vet Med* 13:205-215.
- Salih-Alj DH, Cloeckaert A, Bezard G, Dubray G y Zygmunt MS (1996) Enzyme-linked immunosorbent assay with partially purified cytosoluble 28-kilodalton protein for serological differentiation between *Brucella melitensis*-infected and *B. melitensis* Rev.1-vaccinated sheep. *Clin Diagn Lab Immunol* 3:305-308.
- Samadi A, Ababneh MM, Giadinis ND y Lafi SQ (2010) Ovine and Caprine Brucellosis (*Brucella melitensis*) in Aborted Animals in Jordanian Sheep and Goat Flocks. *Vet Med Int* 2010:458695.
- Samaha H, Al-Rowaily M, Khoudair RM y Ashour HM (2008) Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerg Infect Dis* 14:1916-1918.
- Samartino LE, Traux RE y Enright FM (1994) Invasion and replication of *Brucella abortus* in three different trophoblastic cell lines. *Zentralbl Veterinarmed B* 41:229-236.
- Samartino LE (2002) Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* 90:71-80.
- Samartino L, Gil A y Elzer P. (2005) Capacity building for surveillance and control of bovine and caprine brucellosis. *FAO/WHO/OIE Expert and Technical Consultation. Appendix 3: Expert consultation, 55-66. 14-6-2005. Rome, Italy. Capacity building for surveillance and control of zoonotic diseases.*
- Sanogo M, Abatih E, Thys E *et al.* (2013) Importance of identification and typing of *Brucellae* from West African cattle: a review. *Vet Microbiol* 164:202-211.
- Sanz C, Sáez JL, Álvarez J *et al.* (2010) Mass vaccination as a complementary tool in the control of a severe outbreak of bovine brucellosis due to *Brucella abortus* in Extremadura, Spain. *Prev Vet Med* 97:119-125.
- Sauret JM y Vilissova N (2002) Human brucellosis. *J Am Board Fam Pract* 15:401-406.
- Sayin-Kutlu S, Kutlu M, Ergonul O *et al.* (2012) Laboratory-acquired brucellosis in Turkey. *J Hosp Infect* 80:326-330.

- Scharp DW, al Khalaf SA, al Muhanna MW, Cheema RA y Godana W (1999) Use of mass vaccination with a reduced dose of REV 1 vaccine for *Brucella melitensis* control in a population of small ruminants. *Trop Anim Health Prod* 31:135-141.
- Schiemann B y Staak C (1971) *Brucella melitensis* in impala (*Aepyceros melampus*). *Vet Rec* 88:344.
- Schlabritz-Loutsevitch NE, Whatmore AM, Quance CR *et al.* (2009) A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *J Med Primatol* 38:70-73.
- Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J *et al.* (2008a) Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg Infect Dis* 14:1316-1317.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I *et al.* (2008b) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:375-382.
- Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G *et al.* (2009) Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9:153-156.
- Scholz HC, Nockler K, Gollner C *et al.* (2010) *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:801-808.
- Schurig GG, Roop RM, Bagchi T *et al.* (1991) Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 28:171-188.
- Schurig GG, Sriranganathan N y Corbel MJ (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 90:479-496.
- Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Brucellosis in Sheep and Goats. European Commission. SANCO.C.2/AII/R23/2001, 1-89. 2001.
- Seco-Mediavilla P, Verger JM, Grayon M *et al.* (2003) Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:647-651.
- Seleem MN, Boyle SM y Sriranganathan N (2010) Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol* 140:392-398.
- Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzzo A y Fenizia D (1999) Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. *J Dairy Res* 66:313-317.
- Sherman DM (2011) The spread of pathogens through trade in small ruminants and their products. *Rev Sci Tech* 30:207-217.

- Shome R, Krithiga N, Muttannagouda RB *et al.* (2013) Draft Genome Sequence of *Brucella melitensis* Strain ADMAS-G1, Isolated from Placental Fluids of an Aborted Goat. *Genome Announc* 1.
- Sieira R, Comerci DJ, Pietrasanta LI y Ugalde RA (2004) Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* virB operon. *Mol Microbiol* 54:808-822.
- Sifuentes-Rincon AM, Revol A y Barrera-Saldana HA (1997) Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Mol Med* 3:734-739.
- Sinha D, Singh D, Bishor V y Goswami T (2007) Cell mediated immune response in sheep vaccinated with *Brucella melitensis* Rev. 1. *Indian Journal of Animal Sciences* 77:799-803.
- Sislema-Egas F, Cespedes S, Fernandez P *et al.* (2012) Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1\_0263 and BAB1\_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*.
- Skendros P y Boura P (2013) Immunity to brucellosis. *Rev Sci Tech* 32:137-147.
- Smits HL (2013) Brucellosis in pastoral and confined livestock: prevention and vaccination. *Rev Sci Tech* 32:219-228.
- Soberon-Mobarak A, Díaz-Aparicio E, Torres-Armenta J, Adams LG and Suarez-Guemes F (2000) Absence of shedding of two *B. abortus* strains in goats after vaccination with live vaccines. *Vaccine* 18:3018-3020.
- Soleimani M, Shams S y Majidzadeh A (2013) Developing a real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification assay as a rapid and accurate method for detection of Brucellosis. *J Appl Microbiol* 115:828-834.
- Song L, Li J, Hou S, Li X y Chen S (2012) Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Brucella* spp. and application to milk and blood samples. *J Microbiol Methods*.
- Squarcione S, Maggi P, Lo CS, De GM y Carbonara S (1990) A case of human brucellosis caused by accidental injection of animal vaccine. *G Ital Med Lav* 12:25-26.
- Stantic-Pavlinic M, Cec V y Mehle J (1983) Brucellosis in spouses and the possibility of interhuman infection. *Infection* 11:313-314.
- Stevens MG, Pugh GW, Jr. y Tabatabai LB (1992) Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice. *Infect Immun* 60:4407-4409.

- Stoenner HG y Lackmann DB (1957) A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. Am J Vet Res 18:947-951.
- Stoffregen WC, Olsen SC, Jack WC *et al.* (2007) Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. J Vet Diagn Invest 19:227-237.
- Stournara A, Minas A, Bourtzi-Chatzopoulou E *et al.* (2007) Assessment of serological response of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev-1 vaccine by fluorescence polarization assay (FPA) and other serological tests for *B. melitensis*. Vet Microbiol 119:53-64.
- Suraud V, Jacques I, Olivier M y Guilloteau LA (2008) Acute infection by conjunctival route with *Brucella melitensis* induces IgG+ cells and IFN-gamma producing cells in peripheral and mucosal lymph nodes in sheep. Microbes Infect 10:1370-1378.
- Task force on monitoring animal disease eradication. Eradication of Bovine, Sheep and Goats Brucellosis in the EU accepted by the 'Bovine' and 'Sheep and Goats' Brucellosis subgroups of the Task Force on monitoring animal disease eradication. (2009a) European Commission Health and Consumers Directorate-General Unit 04-Veterinary Control programmes. SANCO/6095/2009, 1-31.
- Task force on monitoring animal disease eradication. (2009b) Working document on eradication of bovine, sheep and goats brucellosis in the EU. 2009b. SANCO/6095/2009.
- Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B y Herman LM (2000) Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. J Appl Microbiol 88:69-80.
- The Center for Food Security and Public Health. Ovine and Caprine Brucellosis: *Brucella melitensis*. Iowa State University. 1-5. 2009.
- Thompson I, McGiven J, Sawyer J *et al.* (2009) Competitive electrochemiluminescence wash and no-wash immunoassays for detection of serum antibodies to smooth *Brucella* strains. Clin Vaccine Immunol 16:765-771.
- Tibor A, Jacques I, Guilloteau L *et al.* (1998) Effect of P39 gene deletion in live *Brucella* vaccine strains on residual virulence and protective activity in mice. Infect Immun 66:5561-5564.
- Tiller RV, De BK, Boshra M *et al.* (2009) Comparison of two multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis methods for molecular strain typing of human



- Brucella melitensis* isolates from the Middle East. J Clin Microbiol 47:2226-2231.
- Tiller RV, Gee JE, Frace MA *et al.* (2010a) Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. Appl Environ Microbiol 76:5837-5845.
- Tiller RV, Gee JE, Lonsway DR *et al.* (2010b) Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. BMC Microbiol 10:23.
- Tittarelli M, Di VM, de MF *et al.* (2005a) The persistence of *Brucella melitensis* in experimentally infected ewes through three reproductive cycles. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52:403-409.
- Tittarelli M, Giovannini A, Conte A *et al.* (2005b) The use of homologous antigen in the serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella melitensis*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52:75-81.
- Tittarelli M, Giovannini A, de MF, Di VM y Caporale V (2006) An indirect ELISA for the detection of antibody in milk from sheep experimentally infected with *Brucella melitensis* biovar 3. Vet Ital 42:129-136.
- Tolari F y Salvi G (1980) Segnalazione di un caso di orchite bilaterale in un capretto in seguito a vaccinazione con Rev. 1. Estrato dagli Anm Faculta Med Vet:33.
- Tomaso H, Kattar M, Eickhoff M *et al.* (2010) Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of Brucellae in tissue using quantitative real-time PCR. BMC Infect Dis 10:100.
- Traum J. Annual report to the chief bureau of animal industry U.S. Department of Agriculture p. 30. 1914.
- Traxler RM, Lehman MW, Bosserman EA, Guerra MA y Smith TL (2013) A literature review of laboratory-acquired brucellosis. J Clin Microbiol 51:3055-3062.
- Unel S, Erdem R, Williams CF y Stableforth AW (1969) *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. Experiments on the duration of immunity. First pregnancy challenge. Res Vet Sci 10:254-259.
- Uysal Y (1995) Field experience with Rev1 vaccine in Turkey.
- Valdezate S, Navarro A, Villalon P, Carrasco G y Saez-Nieto JA (2010) Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella melitensis* strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing,



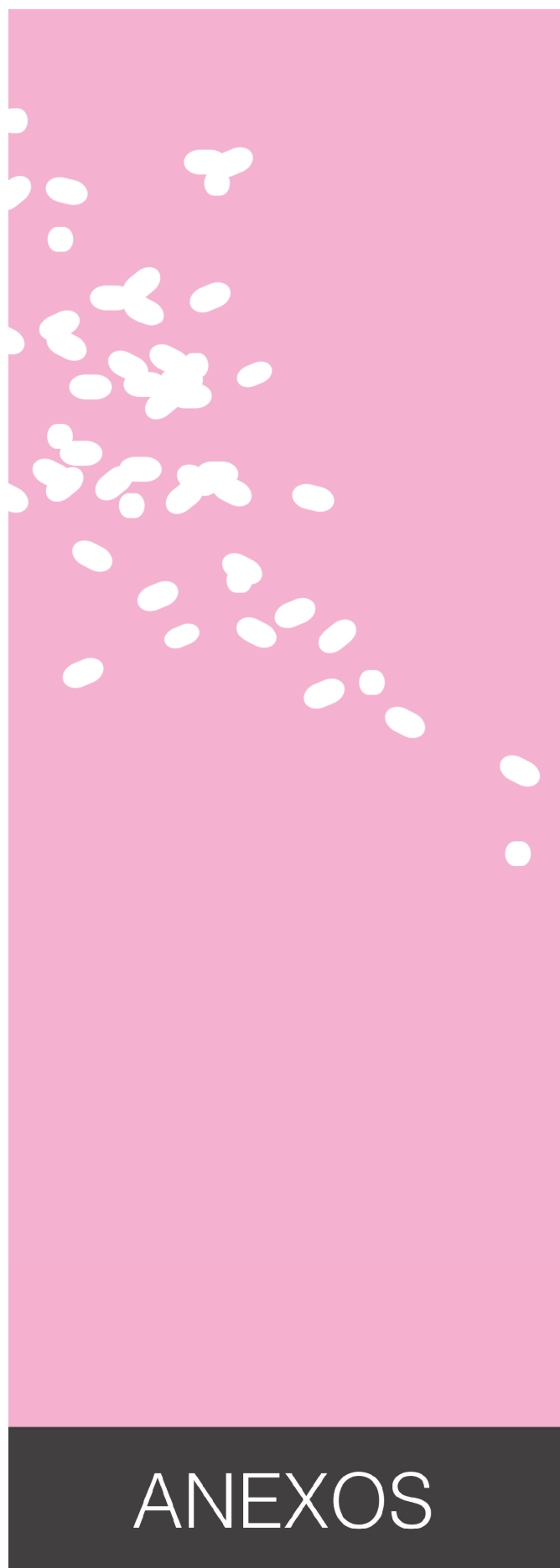
- hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and rpoB typing. J Clin Microbiol 48:2734-2740.
- van Drimmelen GG (1960) Control of brucellosis in sheep and goats by means of vaccination. Journal of South African Veterinary Medical Association 31:129-138.
- van Drimmelen GG y Horwell FD (1964) Preliminary findings with the use of *Brucella melitensis* strain Rev. 1 as a vaccine against Brucellosis in cattle. Bull Off int Épiz 62:987-995.
- Van Heerden KM y Van Rensburg S (1962) The immunization of rams against ovine brucellosis. J S Afr Vet Med Assoc 33:143.
- Vassallo DJ (1992) The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. J R Army Med Corps 138:140-150.
- Velasco J, Díaz R, Grillo MJ *et al.* (1997) Antibody and delayed-type hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic and outer membrane antigens in infections by smooth and rough *Brucella* spp. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 4:279-284.
- Velasco J, Romero C, López-Goni I *et al.* (1998) Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. Int J Syst Bacteriol 48 Pt 3:759-768.
- Verger JM, Garin-Bastuji B, Grayon M y Mahe AM (1989) Bovine brucellosis caused by *Brucella melitensis* in France. Ann Rech Vet 20:93-102.
- Verger JM, Grayon M, Zundel E, Lechopier P y Olivier-Bernardin V (1995) Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. Vaccine 13:191-196.
- Verger JM, Grimont F, Grimont PAD y Grayon M (1985) *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic-acid hybridization. International Journal of Systematic Bacteriology 35:292-295.
- Vershilova PA (1961) The use of live vaccine for vaccination of human beings against brucellosis in the USSR. Bull World Health Organ 24:85-89.
- Vizcaíno N, Cloeckert A, Verger J, Grayon M y Fernandez-Lago L (2000) DNA polymorphism in the genus *Brucella*. Microbes Infect 2:1089-1100.
- Waghela S, Wandera JG y Wagner GG (1980) Comparison of four serological tests in the diagnosis of caprine brucellosis. Res Vet Sci 28:168-171.

- Ward D, Jackson R, Karomatullo H *et al.* (2012) Brucellosis control in Tajikistan using Rev 1 vaccine: change in seroprevalence in small ruminants from 2004 to 2009. *Vet Rec* 170:100.
- Wattam AR, Williams KP, Snyder EE *et al.* (2009) Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J Bacteriol* 191:3569-3579.
- Weynants V, Godfroid J, Limbourg B, Saegerman C y Letesson JJ (1995) Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *J Clin Microbiol* 33:706-712.
- Weynants V, Gilson D, Cloeckert A *et al.* (1997) Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* 65:1939-1943.
- Weynants V, Walravens K, Didembourg C *et al.* (1998) Quantitative assessment by flow cytometry of T-lymphocytes producing antigen-specific gamma-interferon in *Brucella* immune cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 66:309-320.
- Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S *et al.* (2005) Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J Clin Microbiol* 43:761-769.
- Whatmore AM, Shankster SJ, Perrett LL *et al.* (2006) Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 44:1982-1993.
- Whatmore AM (2009) Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol* 9:1168-1184.
- Wilson GS y Miles AA (1932) The serological differentiation of smooth strains of the *Brucella* group. *British Journal of Experimental Pathology* 13:1-13.
- Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63:3741-3751.
- Winchell JM, Wolff BJ, Tiller R, Bowen MD y Hoffmaster AR (2010) Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 48:697-702.
- Winter AJ, Schurig GG, Boyle SM *et al.* (1996) Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *Am J Vet Res* 57:677-683.

- World Health Organisation. The development of new/improved brucellosis vaccines: Report of WHO meeting. (1997). WHO/EMC/ZDI/98.14.
- World Health Organisation, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health. Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7. (2006). Geneva: World Health Organization.
- Worthington RW, Mulders MS, McFarlane IS y Becker D (1973) Serological titres following vaccination of sheep and goats with *Brucella melitensis* rev 1 vaccine. Onderstepoort J Vet Res 40:1-5.
- Wright A y Smith F (1897) Application of serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever. Lancet i.
- Wright A y Semple D (1897) On the Employment of Dead Bacteria in the Serum Diagnosis of Typhoid and Malta Fever. British Medical Journal:1214-1215.
- Xavier MN, Paixao TA, Poester FP, Lage AP y Santos RL (2009) Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. J Comp Pathol 140:149-157.
- Xin X (1986) Orally administrable brucellosis vaccine: *Brucella suis* strain 2 vaccine. Vaccine 4:212-216.
- Yanagi M y Yamasato K (1993) Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol Lett 107:115-120.
- Yang X, Hudson M, Walters N, Bargatze RF y Pascual DW (2005) Selection of protective epitopes for *Brucella melitensis* by DNA vaccination. Infect Immun 73:7297-7303.
- Yang Y, Wang L, Yin J *et al.* (2011) Immunoproteomic analysis of *Brucella melitensis* and identification of a new immunogenic candidate protein for the development of brucellosis subunit vaccine. Mol Immunol 49:175-184.
- Young EJ (1995) Brucellosis: current epidemiology, diagnosis, and management. Curr Clin Top Infect Dis 15:115-128.
- Yu WL y Nielsen K (2010) Review of Detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. Croatian Medical Journal 51:306-313.
- Zammit T. (1905) A preliminary note on the eximiation of the blood of goats suffering from Mediterranean fever, Part III. p.83.

- Zhan Y y Cheers C (1993) Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. Infect Immun 61:4899-4901.
- Zhan Y, Kelso A y Cheers C (1993) Cytokine production in the murine response to *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. Immunology 80:458-464.
- Zinsstag J, Roth F, Orkhon D *et al.* (2005) A model of animal-human brucellosis transmission in Mongolia. Prev Vet Med 69:77-95.
- Zundel E, Verger JM, Grayon M y Michel R (1992) Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: safety and serological responses. Ann Rech Vet 23:177-188.
- Zygmunt MS, Martin JC y Dubray G (1990) Analysis of immune response: comparison of immunoblots after isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using cytoplasmic protein extract from *Brucella*. FEMS Microbiol Lett 58:263-268.
- Zygmunt MS, Gilbert FB y Dubray G (1992) Purification, characterization, and seroactivity of a 20-kilodalton *Brucella* protein antigen. J Clin Microbiol 30:2662-2667.
- Zygmunt MS, Cloeckert A y Dubray G (1994a) *Brucella melitensis* cell envelope protein and lipopolysaccharide epitopes involved in humoral immune responses of naturally and experimentally infected sheep. J Clin Microbiol 32:2514-2522.
- Zygmunt MS, Debbah HS, Cloeckert A y Dubray G (1994b) Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev1 vaccinated sheep. Vet Microbiol 39:33-46.
- Zygmunt MS, Maquart M, Bernardet N, Doublet B y Cloeckert A (2010) Novel IS711-specific chromosomal locations useful for identification and classification of marine mammal *Brucella* strains. J Clin Microbiol 48:3765-3769.







## ANEXO I- LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.: Antes de Cristo  
 ADN: Ácido Desoxirribonucleico  
 AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*  
*B.*: *Brucella*  
 BOC: Brucelosis ovina y caprina producida por *B. melitensis*  
 CA: Ganado caprino  
 CCAA: Comunidades Autónomas  
 CEE: Comunidad Económica Europea  
 CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad  
 E-D: Estreptomicina-dependiente  
*E. coli*: *Escherichia coli*  
 EDO: Enfermedad de Declaración Obligatoria  
 EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
 EE.UU.: Estados Unidos de América  
*et al.* : *et alii* (y otros)  
 ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
 ERIFA: Prueba de inmunofiltración rápida enzimática  
 (*enzymatic rapid immunofiltration assay*)  
 FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura  
 (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)  
 FC: Prueba de Fijación del Complemento  
 Fig.: Figura  
 FITC: isotiocianato de fluoresceína  
 FPA: *Fluorescence Polarization Assay*  
 GLEWS: *Global Early Warning Systems*  
 HRM: *High Melting Resolution*  
 HN: Hapteno nativo  
 HOOF Prints: *Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger-Prints*  
 IFN: Interferón  
 IFN- $\gamma$ : Interferón gamma  
 Ig: Inmunoglobulina  
 IL: Interleuquina  
 Iz1: Izatnagar1  
 L-LPS: LPS propio de las cepas lisas de *Brucella* spp.  
 L: Lisa  
 LAMP: *Loop mediated isothermal amplification*  
 LAMP-IS711: LAMP con diana molecular IS711  
 LPS: Lipopolisacárido  
 MRT: Teste del anillo en leche (*Milk Ring Test*)  
 NE-D: No-estreptomicina dependiente  
 NERIFA: Prueba de inmunofiltración rápida no enzimática (non-*enzymatic rapid immunofiltration assay*)  
 O-PS: Antígeno O del LPS de las cepas lisas de *Brucella* spp.  
*O.*: *Ochrobactrum*  
 OIE: Organización Mundial de la Salud Animal (Oficina Internacional de Epizootias)  
 pb: pares de bases  
 PCR: *Polymerase Chain Reaction*



**M<sub>1</sub>**: rebaño de pequeños rumiantes con estado sanitario desconocido respecto a BOC  
**M<sub>2</sub>**: rebaño de pequeños rumiantes con estado sanitario y medidas de control frente a BOC conocidos  
**M<sub>2+</sub>**: la totalidad del rebaño de ovejas y/o cabras es negativa a las pruebas oficiales de BOC pero no se ha alcanzado aún la clasificación M<sub>3</sub>/M<sub>4</sub>  
**M<sub>2+</sub>**: rebaño de pequeños rumiantes en el que al menos un animal (oveja/cabra) no ha sido negativo a las pruebas oficiales o no ha sido evaluado frente a BOC  
**M<sub>3</sub>**: rebaño ovino y/o caprino indemnes de BOC según el RD2121/1993  
**M<sub>4</sub>**: rebaño ovino y/o caprino oficialmente libre de BOC según RD2121/1993  
**MS**: rebaños de ovino/caprino M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> con calificación suspendida según el RD1716/2000  
**MR**: rebaños de ovino/caprino M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> con calificación retirada según el RD1716/2000  
**Mb**: Megabases  
**MLVA**: *Multiple Loci VNTR Analysis*  
**NK**: *Natural Killers*  
**OL**: Oficialmente Libre  
**OMS**: Organización Mundial de la Salud  
**OV**: Ganado ovino  
**p.e.**: por ejemplo  
**R-LPS**: LPS propio de las cepas rugosas de *Brucella* spp.  
**R**: Rugosa  
**RAPD**: *Random Amplified Polymorphic DNA*  
**RB**: Prueba del Rosa de Bengala  
**RD**: Real Decreto  
**RER**: Retículo endoplasmático rugoso  
**Rev. 1**: *Brucella melitensis* cepa vacunal Rev. 1  
**RFPL**: *Restriction Fragment Length Polymorphism*  
**RI**: Respuesta inmune  
**RT-PCR**: PCR en tiempo real  
**S.**: Siglo  
**SAT**: Seroaglutinación en tubo  
**SNP**: *Single-Nucleotide Polymorphisms*  
**Spp.**: las especies del Género  
**T4SS**: Sistema de Secreción Tipo IV  
**TF**: *Trigger Factor*  
**TR-FRET**: *Time Resolved Fluorescent Resonance Energy Transfer*  
**TRADE**: *Trade Control and Expert System*  
**UE**: Unión Europea  
**UFC**: Unidades Formadoras de Colonias  
**UVL**: Unidad Veterinaria Local  
**Tb**: Tbilisi  
**TNF**: Factor de Necrosis Tumoral  
**VTNR**: *Variable Number of Tandem Repeats*  
**Wb**: Weybridge  
***Y. enterocolitica***: *Yersinia enterocolitica*  
**ZEI**: Zonas de Especial Incidencia

## ANEXO II- LISTA DE FIGURAS

**Figura I.** Encuadre taxonómico y principales características de las especies del género *Brucella*. (pág. 8).

**Figura II.** Esquema sobre la estructura de la pared bacteriana de *Brucella melitensis* incluyendo la composición química del O-PS y lípido A del L-LPS. Imagen de Cardoso *et al.*, 2011 (Microbial Cell Factories 2006; 5) (pág. 11).

**Figura III.** Cortes histológicos teñidos mediante el método de Hematoxilina-Eosina convencional. Las imágenes muestran cortes histológicos de diferentes órganos de fetos abortados debido a una infección con *B. melitensis*. Los órganos linfoides estudiados (bazo, ganglios mediastínicos, retrofaríngeos y mesentéricos) mostraban un fenómeno de activación de los folículos linfoides en los que además se podía apreciar una depoblación celular en el centro germinal (depleción linfóide) sustituida por detritus celulares y activación de células reticulares y la práctica ausencia de linfoblastos más evidente en la pulpa (Fig. A. Bazo; Fig. B y C. Hígado; Fig. D y E. Pulmón) (pág. 20).

**Figura IV.** Cortes histológicos teñidos mediante el método de Hematoxilina-Eosina convencional. Las imágenes muestran cortes histológicos de diferentes órganos con lesiones causadas por una infección con *B. melitensis* en ovejas preñadas. Se observa una evidente activación del tejido linfóide consistente en una hiperplasia folicular marcada (Fig. A) de los ganglios linfoides con marcada depleción linfóide del centro germinal (Fig. B). El resto de los órganos muestran infiltrados de células redondas con predominio perivascular se puede apreciar en hígado (Fig. C) y pulmón (Fig. D) (pág. 21).

**Figura V.** Cortes histológicos teñidos mediante el método de Hematoxilina-Eosina convencional. Las imágenes muestran cortes histológicos de diferentes órganos con lesiones causadas por una infección con *B. melitensis* en ovejas preñadas. La placenta de estos animales muestra una inflamación intensa consistente en una placentitis necrotizante (Fig. A) o hemorrágica en algunos casos. En todos los casos se aprecian cambios degenerativos y necróticos en el área trofoblástica de la membrana corioalantoidea y la parte terminal de los cotiledones. En algunas áreas se observa la necrosis superficial del epitelio trofoblástico (Fig. B) que a veces se extiende al tejido conjuntivo subyacente (ulceración corioalantoidea). El tejido intercotiledonario de la zona presenta imágenes necróticas similares. En la mayoría de los casos se aprecian grandes colonias de bacterias (Fig. C) acompañadas de una infiltración de macrófagos y neutrófilos (Fig. D) (pág. 22).

**Figura VI.** Ciclo biológico de *B. melitensis* (pág. 23)

**Figura VII.** Situación mundial respecto a *B. melitensis* en animales salvajes durante el primer semestre de 2013 (en aquellos países sin datos para este periodo se ha indicado la información disponible más reciente) (pág. 27).

**Figura VIII.** Situación mundial respecto a *B. melitensis* en animales domésticos durante el primer semestre de 2013 (en aquellos países sin datos para este periodo se ha indicado la información disponible más reciente) (pág. 29).

**Figura IX.** Mapa epidemiológico de la situación de la brucelosis ovina y caprina en las comarcas ganaderas de España (8A. Prevalencia de rebaño en el año 2012, 8B. Incidencia en animales en el año 2012). En la leyenda de cada imagen pueden observarse la relación de colores y su significado en cada uno de los mapas (DIRECCION GENERAL DE RECURSOS AGRICOLAS Y GANADEROS, SUBDIRECCION GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA, & Ministerio de Agricultura 2012) (Fuente: Subdirección General de Sanidad e

Higiene Animal y Trazabilidad, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (pág. 31).

**Figura X.** Oveja inmunizada con Rev. 1 por vía conjuntival. Se suele incorporar un colorante (azul de Evans, por ejemplo) que facilita su correcta aplicación (pág. 78)

**Figura XI.** Esquema de actuación para la toma de decisiones sobre el programa de lucha contra la brucelosis de los pequeños rumiantes en una determinada región o país (Adaptado de Garin-Bastuji, 2012. Comunicación oral: Brucellosis in Cattle, Sheep and Goats: Fundamentals of surveillance and eradication programs, Thailand-Japan Conference on Animal Health, the 25th Year Anniversary of National Institute of Animal Health, Bangkok, Tailandia, 30-31 Mayo de 2012) (pág. 97).

**Figura XII.** Evolución de los indicadores epidemiológicos indicados en el Plan Nacional de Erradicación de la Brucelosis Ovina y Caprina año 2012. Los datos del año 2011 han sido extraídos del Informe Final Técnico-Financiero Programa Nacional de la brucelosis ovina y caprina año 2011: 10A) Seroprevalencia de rebaño (años 1993-2011), 10B) Incidencia en animales (1993-2011) y C) Proporción de explotaciones con calificación M3 y M4 (2002-2011) (Fuentes: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad) (pág. 106).

**Figura XIII.** Evolución de la prevalencia a nivel de rebaño de brucelosis en los pequeños rumiantes (línea azul) y casos notificados de brucelosis humana (expresado como Tasas notificadas a nivel estatal por cada 100000 habitantes, línea roja) en el periodo comprendido entre 1997 y 2011 en España (Fuentes: i) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad: datos de sanidad animal y ii) Instituto de Salud Carlos III) (pág. 107).

## ANEXO III- LISTA DE TABLAS

**Tabla I.** Características diferenciales de las especies del género *Brucella* (pág. 10).

**Tabla II.** Principales estudios sobre la sensibilidad de la Prueba del Rosa de Bengala desarrollados desde el año 2000 hasta la actualidad (pág. 46).

**Tabla III.** Principales estudios sobre la especificidad de la Prueba del Rosa de Bengala desarrollados desde el año 2000 hasta la actualidad (pág. 46).

**Tabla IV.** Principales estudios sobre la sensibilidad de la Prueba de la Fijación del Complemento desarrollados desde el año 2000 hasta la actualidad (pág. 48).

**Tabla V.** Principales estudios sobre la especificidad de la Prueba de la Fijación del Complemento desarrollados desde el año 2000 hasta la actualidad (pág. 48).

**Tabla VI.** Principales estudios sobre la sensibilidad de técnicas ELISA desarrolladas desde el año 2000 hasta la actualidad (pág. 52-53).

**Tabla VII.** Principales estudios sobre la especificidad de técnicas ELISA desarrolladas desde el año 2000 hasta la actualidad (pág. 54-55).

**Tabla VIII.** Principales estudios sobre la sensibilidad de técnica FPA desarrolladas desde el año 2000 hasta la actualidad (pág. 58).

**Tabla IX.** Principales estudios sobre la especificidad de la técnica FPA desarrolladas desde el año 2000 hasta la actualidad (pág. 59).

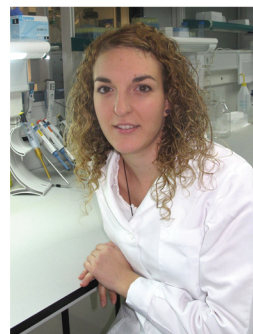
**Tabla X.** Medidas de control y/o erradicación que pueden ser aplicadas en una determinada unidad epidemiológica de intervención (rebaño, zona, etc.) en función de la prevalencia colectiva observada y otros factores a considerar (Fuente: JM Blasco en *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East, FAO technical meeting in collaboration with WHO and OIE, 2009; Blasco, 2010) (pág. 87).

**Tabla XI.** Resumen de medidas a aplicar del Programa de Erradicación de la brucelosis ovina y caprina (*B. melitensis*) para el año 2014 comunes a todas las comunidades autónomas (Fuente: Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (pág. 109).

**Tabla XII.** Principales medidas del Programa de Erradicación de la brucelosis ovina y caprina (*B. melitensis*) para el año 2014 en función de la situación epidemiológica de las diferentes comunidades autónomas (Fuente: Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (pág. 110-111).



Durante más de 100 años la lucha contra la brucelosis ovina y caprina (BOC) ha tenido como objetivo el control y posterior erradicación de esta importante zoonosis que afecta de manera dramática a la producción animal. El control de BOC



se apoya fundamentalmente en dos grandes pilares (además de estrictas medidas de bioseguridad): la vacunación con Rev. 1 y el sacrificio de animales seropositivos. No obstante, existen ciertas limitaciones que han dificultado el éxito de la aplicación de estas estrategias en ciertas situaciones epidemiológicas. En este contexto, el desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico y prevención de *B. melitensis* puede constituir una herramienta importante para el control de este patógeno en los rumiantes domésticos. El primer capítulo de la presente tesis se centra en la evaluación de la utilidad de las técnicas moleculares de detección y caracterización de *Brucella* spp. en el contexto de distintos programas de lucha contra la brucelosis animal. El segundo capítulo de esta tesis aborda el estudio de nuevas aproximaciones para la inmunización frente a *B. melitensis* en el ganado ovino, bien a través de la valoración de una estrategia alternativa para la aplicación de la Rev. 1 o bien mediante la evaluación de la cepa B115 como vacuna para la inmunización de ovejas preñadas.

Madrid, junio de 2014

